N° d'Enregistrement
au C.N.R.S. :

THÈSE DE DOCTORAT D'ETAT
ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Alphonse BENOIT

pour obtenir
le grade de Docteur ès Sciences

Sujet de la Thèse :

TRANSMISSION DES VIRUS PAR LA GRAINE

- Analyse de la non-transmission
dans le cas du virus de la Mosaïque du Tabac
chez le Tabac

soutenue le .... Mars 1973 devant la Commission d'Examen :

MM.	*CHADEFAUD*	*Président*
	MAGNE	*Examinateurs*
	VIENNOT-BOURGIN	*Examinateurs*
	CORNUET	*Membre invité*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548017_0015

N° d'Enregistrement
au C.N.R.S. :

THÈSE DE DOCTORAT D'ETAT ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Alphonse BENOIT

pour obtenir
le grade de Docteur ès Sciences

Sujet de la Thèse :

TRANSMISSION DES VIRUS PAR LA GRAINE

- Analyse de la non-transmission dans le cas du virus de la Mosaïque du Tabac chez le Tabac

soutenue le .... Mars 1973 devant la Commission d'Examen :

MM.	*CHADEFAUD*	*Président*
	MAGNE	*Examinateurs*
	VIENNOT-BOURGIN	*Examinateurs*
	CORNUET	*Membre invité*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION

A. Généralités

1. Dissémination des virus des végétaux.

2. Transmission du virus par la graine.

3. Importance économique de la transmission par la graine.

B. Historique

1. Généralités.

2. Localisation du virus dans la graine.

3. Facteurs pouvant empêcher la transmission du virus par la graine.

3.1. Etude au niveau du pollen et des ovules.

3.2. Etude au niveau de la graine.

3.2.1. Immunité de l'embryon.

3.2.2. Inactivation du virus dans l'embryon.

3.2.3. Présence d'inhibiteurs.

3.2.4. Evolution du virus au cours de la conservation de la graine.

3.3. Etude au niveau de la plantule.

C. Problèmes à résoudre.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Choix du complexe virus-hôte.

1. Choix du virus.

2. Matériel végétal.

3. Inoculum et inoculation.

3.1. Préparation de l'inoculum.

3.1.1. Technique de purification par PEG.

3.1.2. Centrifugation en gradient de densité.

3.1.3. Dosage spectrophotométrique.

3.2. Inoculation.

B. Etude du pouvoir infectieux.

1. Préparation de l'inoculum.

2. Inoculation,

3. Interprétation des résultats.

C. Etude sérologique.

1. Préparation du sérum.

2. Tests sérologiques.

2.1. Précipitation en anneau.

2.2. Double diffusion en agar.

2.3. Immunoélectrophorèse.

2.4. Immunofluorescence.

2.5. Détection de l'antigène au moyen d'enzymes marqueurs.

2.6. Test au latex.

D. Techniques diverses.

1. Coupes à la paraffine.

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

3. Milieu de culture.

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Première partie.

Détection du virus dans différentes parties des plantes porte-graines par voie biologique.

A. Recherche du virus au niveau des boutons floraux et des fleurs.

B. Recherche du virus au niveau du pollen.

1. Etude du pouvoir infectieux du pollen.

2. Etude par fécondation artificielle.

C. Recherche au niveau des graines.

1. Pouvoir infectieux des graines.

2. Localisation de l'infection dans la graine.

3. Evolution du pouvoir infectieux au cours de la conservation des graines.

D. Recherche au niveau des plantules.

Deuxième partie.

Etudes sérologiques.

A. Purification des immunoglobulines (IgG)MT.

1. Dissociation du complexe antigène-anticorps.

a. Estimation du rapport de concentration antigène-anticorps.

b. Dissociation du complexe antigène-anticorps.

c. Technique de purification des IgG-MT.

2. Relargage fractionné par le sulfate d'ammonium.

B. Caractérisation des IgG-MT par immunoélectrophorèse.

C. Comparaison de l'activité anticorps des différentes IgG-MT purifiées et détermination de la sensibilité du test au latex.

Détection du virus de la Mosaïque du Tabac dans différentes parties des plantes porte-graines par voie sérologique.

A. Test au latex sur :

1. des boutons floraux.

2. des fleurs.

3. les plantules.

B. Analyse des extraits des plantules par immunoélectrophorèse et électrophorèse en gel de polyacrylamide.

C. Obtention de protoplastes de pollen.

1. Essai à partir de pollen mûr.

2. Obtention à partir de pollen immature.

D. Détection de l'infection par immunofluorescence et immunoperoxydase sur :

1. le bouton floral.

2. le protoplaste de pollen.

3. les graines.

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

AVANT - PROPOS

Nous exprimons notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur M. CHADEFAUD qui nous a permis de préparer cette thèse sous son patronage et nous a fait l'honneur de présider le Jury.

Nous assurons Monsieur le Professeur G. VIENNOT-BOURGIN de notre plus vive reconnaissance pour son extrême amabilité, ses conseils précieux et la minutie avec laquelle il a examiné l'exécution du travail et la rédaction du manuscrit. Sa participation à notre jury de thèse est un témoignage supplémentaire de son intérêt pour notre travail.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur F. MAGNE qui a bien voulu accepter de participer à ce jury.

Ce travail a été entrepris au sein de la Station de Pathologie Végétale de l'I.N.R.A. à VERSAILLES, grâce à la bienveillance de son Directeur Monsieur P. CORNUET, qui a bien voulu nous accueillir dans le Service de Virologie, accepter le sujet, suggérer l'élaboration de la technique d'immunofluorescence et enfin nous honorer de sa présence dans le jury. Nous tenons à lui rendre hommage ici.

Nos premiers pas dans le domaine de la Virologie Végétale ont été guidés par Monsieur Y. MAURY. La formation que nous avons acquise auprès de lui, ainsi que lors des stages qu'il a organisés, ses encouragements précieux et son aide si efficace au cours de la rédaction finale de ce travail avec beaucoup de patience et de compréhension nous ont tout particulièrement aidé dans la réalisation de ce travail. Nous lui adressons nos plus sincères remerciements et l'assurance de notre amitié.

Nous sommes reconnaissant envers Mademoiselle AUGIER de MONTGREMIER H., MM. J.C. DEVERGNE, J. DUNEZ, A. FAIVRE-AMIOT, A. VUITTENEZ, ainsi qu'envers leurs collaborateurs. La formation que nous avons reçue au cours de notre séjour dans leur laboratoire nous a aidé à mener à bien ce travail et nous sommes heureux de leur exprimer ici nos plus sincères remerciements.

Nous remercions également MM. S.ESSAD et G.PELLETIER de la Station d'Amélioration des Plantes pour avoir mis à notre disposition les moyens matériels pour la microtomie et nous avoir aidé dans la préparation des protoplastes de pollen.

Nous adressons nos remerciements à Mademoiselle F.LACUERRIERE Madame C.KUSIAK, MM.G.MOLIN et J.BERTRANDY pour l'aide amicale qu'ils nous ont apportée.

Nous sommes redevables à Madame G.LAURENT, Mademoiselle A.LUCE, Madame H.MILLEY qui ont aimablement assuré la réalisation de ce travail et à M.ROUSSEAU du Service de Dessin et du Service de Photographie du C.N.R.A. qui a assuré avec soin la reproduction de nos documents.

Nous remercions l'ensemble des collègues de la Station de Pathologie Végétale pour nous avoir permis de passer un agréable séjour auprès d'eux.

Ce travail a pû être poursuivi grâce à une bourse du Ministère des Affaires Etrangères de France. Nous tenons à exprimer, aux services responsables, par l'intermédiaire du Centre Régional d'Oeuvre Universitaire Scolaire nos remerciements pour les facilités matérielles qui nous ont été données.

Nous remercions enfin tous ceux qui nous ont aidé de quelque façon que ce soit dans la réalisation de ce travail.

I - INTRODUCTION

A - GENERALITES.

Le rapide développement de la virologie végétale et le nombre toujours croissant des publications dans ce domaine sont liés très largement aux problèmes économiques posés à l'agriculture par les maladies à virus. Néanmoins notre connaissance de la transmission des virus végétaux qui détermine leur dissémination est loin d'être complète.

1. Dissémination des virus des végétaux.

Les virus des végétaux n'arrivant pas à pénétrer la cuticule et les membranes cellulosiques de la plante-hôte sont transmis soit mécaniquement, soit par l'intermédiaire d'un vecteur tel que des insectes, des nématodes et des champignons.

Cette transmission est aussi assurée par le passage direct du virus dans le matériel végétal qui sert à propager l'espèce, comme les graines et les boutures, ce qui réalise une dissémination naturelle du virus.

2. Transmission du virus par la graine.

Un virus est dit " transmis par la graine" quand la graine infectée permet le passage du virus à la plantule.

Ces relations hôte-virus, qui favorisent le passage du virus d'une génération à l'autre, sont évidemment sujettes à des variations dépendant du milieu. Ce qui intrigue dans ce phénomène, c'est le faible nombre de complexes hôte-virus qui le manifestent. En effet, environ un virus sur dix décrits, avec 120 relations hôte-virus, sont inclus dans cette catégorie de possibilité de transmission.

Une compréhension de ce mécanisme nécessite l'étude de la relation entre l'ontogénie de la graine, sa structure et, d'autre part, l'infection et la transmission. Une telle étude, de caractère fondamental, permettra de mieux prévenir la dissémination de la maladie ayant une importance économique.

3. Importance économique de la transmission par la graine.

Il faut éviter de sous-estimer l'importance économique de la transmission des virus par la graine.

La semence apporte une source de virus qui peut se disséminer dans la culture et provoquer alors une perte très variable dans la récolte. A titre d'exemple, dans des cultures de Haricot, si 50 pour cent des graines transmettent le virus - ce qui est le cas lorsque la plante a été infectée de façon très précoce - la perte provoquée est de l'ordre de 10 pour cent. Dans les cultures de Laitue avec la Mosaïque de la laitue , on constate que l'incidence de l'infection des graines est beaucoup plus importante : à partir de 2 à 3 pour cent de graines infectées, le pourcentage de plants malades en culture peut varier de 25 à 96 pour cent. (NEERGAARD, Communication personnelle).

Selon RAYCHAUDHURI (1968), en Inde, les cultures de Légumineuses sont atteintes au moins par sept virus transmis par la graine, ce qui se traduit par une perte substancielle de récolte. Ce problème est amplifié par la conservation du virus dans la graine, d'une saison à l'autre.

Ainsi le virus est introduit au hasard dans les champs et donne de nombreux foyers d'infection primaire. Cet inoculum est beaucoup plus efficace que celui provenant de l'extérieur du champ car la multiplicité des foyers est un facteur très important de dissémination du virus lorsqu'un autre mode de transmission se surajoute (LISTER et MURANT, 1967, MURANT et LISTER, 1967). Par ailleurs le commerce des graines constitue un facteur très important de dissémination des virus sur de larges zones géographiques, d'où l'intérêt d'élaborer des techniques rapides et sûres de détection et de contrôler l'état sanitaire des semences dans chaque pays. Une lutte directe, efficace contre les virus transmis par la graine, n'étant pas le plus souvent,possible , il importe donc d'utiliser des graines certifiées sans virus. Citons le contrôle de l'état sanitaire du virus de la Mosaïque de la Laitue pour lequel la limite de tolérance est de 0,1 pour cent (TOMLINSON, 1962) et le virus de la Mosaïque commune du Haricot 0,0 pour cent pour la semence de base et 0,5 pour cent pour la semence certifiée (Norme officielle du Service Officiel de Contrôle, 1969). De même doit-on contrôler très strictement l'état sanitaire des pépinières de porte-greffes pour les arbres fruitiers, la transmission par la graine s'avérant responsable d'une part importante des pertes subies : exemple le "Ring spot" et le "prune dwarf" du Cerisier (GEORGE et DAVIDSON, 1963). Un inventaire de la répartition géographique de ces virus, une détection et une interception dans des stations de quarantaine lors de l'admission des semences devraient aboutir à un contrôle efficace de ce mode de

dissémination , surtout à un moment où les échanges internationaux de matériel végétal ont pour but l'amélioration génétique des plantes pour les adapter à l'agriculture d'aujourd'hui.

B - HISTORIQUE.

1. Généralités.

Aucune conception cohérente concernant le mécanisme de la transmission du virus par la graine n'est bien élaborée. Nous avons vu que le virus n'est transmis à la descendance par la graine que dans peu de cas, environ 10 pour cent des systèmes-hôtes-virus décrits. Cette transmission n'apparaît ni comme propriété d'un genre ou d'une famille de plantes-hôtes, ni comme celle d'un type morphologique de virus. Néanmoins, on peut tenter de regrouper certains caractères des virus transmis par la graine:

1/ Ils provoquent des symptômes de maladies du type mosaïque, marbrure, lésions nécrotique ou chlorotique dans les parenchymes, mais pas de symptômes de type jaunisse caractéristiques des maladies des tissus vasculaires.

2/ Ils sont transmissibles mécaniquement.

3/ Certains sont transmis par les pucerons, toujours sur le mode non persistant. Aucun n'est transmis par les cicadelles.

4/ Ils comprennent la plupart des virus transmis par les nématodes (LISTER et MURANT, 1967).

Aucune relation n'a été établie pour la compréhension de l'infection de la graine entre ce phénomène et les différents caractères que nous avons cités. L'étude de la localisation du virus dans la graine et des facteurs qui perturbent cette infection nous permettra de mieux comprendre le phénomène sous sa forme globale.

2. Localisation du virus dans la graine.

Quand la graine est infectée, la localisation du virus peut être :

1/Extra-embryonnaire (téguments ou enveloppes et albumen)

2/ Embryonnaire.

Il est généralement accepté (BENETT , 1934, 40-69, CROWLEY, 1959), que la transmission par la graine se produit quand le virus infecte l'embryon; appelons ce processus, la transmission vraie.

Dans le premier cas, généralement, la transmission à la plante ne se produit pas. (Tableau 1).

Le virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) semble être une exception à cette règle. La présence de ce virus dans la graine de Tabac, de Tomate, de Piment et son éventuelle transmission, a été l'objet de nombreuses études.

ALLARD (1915) a étudié la distribution du virus dans la plante de Tabac, et a trouvé que les racines, les feuilles, les pétales, les anthères, les ovaires, les ovules, les capsules et les graines contiennent le virus. Il a aussi montré que les plantules provenant de ces graines, sont saines, même après repiquage. Après inoculation mécanique par le virus, les plantules âgées d'un mois et demi présentent des symptômes au bout de dix jours.

CHAMBERLAIN (1937) est le seul à rapporter un cas de transmission de ce virus par la graine du Tabac. La localisation du virus dans la graine de Tabac a été étudiée par TAYLOR (1962) en disséquant les téguments et l'ensemble albumen-embryon, et en faisant une épreuve du pouvoir infectieux. Bien que les résultats n'aient pas été reproductibles d'une expérience à l'autre, un taux minimum de 10 pour cent d'infection de la partie albumen + embryon a été enregistré. Les téguments disséqués étaient infectieux, mais le virus n'a pas pu être mis en évidence dans la partie extérieure des téguments. Après mise en culture de ces graines en serre et au champ jusqu'au stade six feuilles, l'auteur n'a pu observer de symptômes de maladie sur aucune plante, ceci, même après repiquage et même lorsque le semis a été effectué en présence de débris capsulaires infectieux.

De plus, le test du pouvoir infectieux auquel ont été soumises des plantules provenant des graines infectées a été entièrement négatif.

Chez la Tomate le mécanisme de la transmission du même virus paraît différent. D'après les travaux de COUSIN (1961), TAYLOR et Coll. (1961) et BROADBENT (1965), le virus se trouve principalement à l'extérieur et à l'intérieur des téguments, alors qu'un faible pourcentage d'albumen est infecté. Le virus n'a jamais été trouvé dans l'embryon. Les plantules obtenues à partir de graines infectées restent saines jusqu'au repiquage.

TABLEAU I - LOCALISATION DU VIRUS

	Virus	Hôte	T	A	E	Transmission	Référence
1.	Severe etch	Hyacimus niger	T	-	-	-	Sheffield (1941)
2.	Maladie Bronzée de la Tomate	Cinereria, Tomate	T	-	-	-	Crowley (1957)
3.	Mosaïque Jaune du Haricot	Haricot	T	-	-	-	"
4.	Mosaïque du Concombre	Concombre	T	-	-	-	"
5.	"	Echinocystis sp.	T	A	-	-	"
6.	Curly top de la betterave	Betterave	T	P	-	-	Bennett et Esau (1936)
7.	Mosaïque du Tabac	Piment	T	-	-	(22%)[a]	McKinney (1952) Crowley (1957)
8.	" "	Tabac	T	A +	E[b]		Crowley (1957) Taylor (1962)
9.	" "	Tomate	T	A	-	+[c]	Taylor et Coll. (1961) Broadbent (1965)
10.	" "	Malus platycarpa Pommier et Poirier	T	+ A[d]	E	(38%)[e]	Gilmer et Wilks (1967)
11.	Pea Streak	Petit Pois	T	-	-	(32%)[f]	Ford (1966)
12.	Mosaïque "Southern Bean du Haricot"	Soja (Lincoln et Virginia)	T	A	E	+[f]	Crowley (1959) Férault et Coll. (1969) Chéo (1955)
		Haricot	T	A	E		
13.	Mosaïque commune du Haricot	Haricot	T	-	E	+	Crowley (1957)
14.	Mosaïque Striée de l'Orge	Orge, Blé	-	A	E	+	Crowley (1959) Gold et Coll. (195
15.	Tache Annulaire du Tabac	Soja (Lincoln et Chippewa)	-	A	E	+	Athow et Bancroft (1959)
		Tabac	-	A	E	+	
16.	"Necrotic Ring spot" du Cérisier	Cerisier	-	-	E	+	Gilmer et Way (196
17.	"Prune dwarf" du Cerisier	"	-	-	E	+	" "

a) souche de virus latente. transmission après repiquage.

b) difficile de séparer albumen et embryon.

c) transmission par contamination pendant repiquage.

d) difficile de séparer enveloppe (T) et albumen (A).

e) transmission directe.

f) virus inactivé dans la graine mûre. graine non mûre infectée.

Abréviations : T : téguments, A : Albumen, P : Périsperme, E : Embryon.

Ce fait a amené les auteurs à conclure que, dans les variétés étudiées, la transmission apparente du virus par la graine de tomate est en fait une contamination des plantules pendant le repiquage. Le virus adsorbé à l'extérieur des graines serait la source principale de contamination des plantules qui en sont issues. Certains traitements décrits par plusieurs auteurs (CHAMBERLAIN et FRY, 1950. ALEXANDER, 1960. TAYLOR et Coll., 1961 et BROADBENT, 1965) inactivent le virus au niveau des téguments mais pas dans l'albumen: ils ont pour effet de supprimer la contamination lors du repiquage des plantules.

Comme dans le cas précédent, on observe une contamination indirecte des plantules pour des lots de graines de Piment infectées par VMT essentiellement au niveau des téguments (Mc KINNEY 1952, CROWLEY 1957).

Cependant le VMT peut être transmis de façon directe à la plantule : c'est le cas du Pommier, du Poirier (GILMER et WILKS, 1967) et de la Vigne (GILMER et KELTS, 1968). Dans les graines de Malus platycarpa un auteur a mis en évidence le virus dans trois embryons et cinq téguments d'un échantillon de dix graines dormantes : mais le même type de recherche effectué par un autre auteur a donné des résultats négatifs pour l'embryon bien qu'un taux de transmission du virus par la graine de 38 pour cent soit enregistré. La teneur en virus dans la graine dormante est faible, mais augmentée considérablement pendant la germination. Cette situation est donc bien différente du cas de transmission du VMT chez la Tomate et le Piment, puisqu'ici le virus considéré comme extra embryonnaire peut infecter la plantule dans les stades précoces de son développement.

En conclusion, un virus peut infecter la graine à différents stades de son développement, sans être transmis. C'est le cas des graines dont la plante porte-graine est infectée systémiquement; le virus peut, soit contaminer la surface (VMT chez Tomate), soit infecter les tissus extra embryonnaires (VMT chez le Tabac, la Tomate, le Piment, le Poirier et le Pommier). Mais pour la transmission à la descendance, il est nécessaire que cette infection soit active jusqu'à la germination des graines et se perpétue dans les plantules à un stade précoce de leur développement. (transmission du VMT chez Tomate, Piment, Poirier et Pommier). Quand l'embryon est infecté, la probabilité de transmission à la plantule est plus grande (cas du virus de la Mosaïque commune du Haricot chez le Haricot, 50 pour cent (NELSON et DOWN, 1933), virus de la mosaïque de la Laitue chez la Laitue, 5,7 pour cent (RYDER , 1964) virus

de la Mosaïque de la Striure de l'Orge chez l'Orge, 64 pour cent (SCOTT, 1961). La relation entre la localisation du virus chez l'embryon et sa forte probabilité de transmission à la plantule nous conduit à analyser les données bibliographiques sur la fréquence d'infection de l'embryon et sur les facteurs qui peuvent empêcher cette localisation ainsi que l'éventuelle transmission par la graine.

3. Facteurs pouvant empêcher la transmission du virus par la graine.

Divers travaux ont eu pour objet l'analyse de facteurs ayant une incidence sur l'infection de l'embryon et le maintien du virus tout au long du développement de la graine.

3.1. Etude au niveau du pollen et des ovules.

Dans les quelques cas étudiés, une corrélation a été établie entre la présence du virus dans le pollen et sa transmission par la graine. (NELSON et DOWN, 1933, GOLD et Coll., 1954, CALLAHAN, 1957, CROWLEY, 1959, GILMER et WAY, 1960, RYDER, 1964, LISTER et MURANT, 1967, TSUCHIZAKI et Al., 1970). Certains exemples que nous citons indiquent cependant qu'il ne suffit pas que le pollen soit infecté pour que la transmission du virus à la plantule s'effectue. MEDINA et GROGAN (1961) ont trouvé le virus de la Mosaïque commune du Haricot dans le pollen et l'ovule du Haricot, or, la transmission de ce virus par la graine est bien connue. Au contraire le virus de la Mosaïque jaune du Haricot, qui n'est pas transmis par la graine, n'a été détecté ni dans l'ovule, ni dans le pollen.

Dans le premier cas, il a été observé une relation entre la date de l'infection du Haricot et la transmission par la graine (NELSON, 1932), l'infection précoce des plantes ayant été suivie d'un taux élevé de transmission alors que l'infection après la floraison ou la formation de la gousse n'a pas été suivie de la transmission des virus à la descendance. Des résultats analogues ont été obtenus avec la Laitue infectée par le virus de la Mosaïque de la Laitue (COUCH, 1955). Selon l'interprétation qui en a été donnée, la transmission du virus dépendrait de l'infection du pollen ou des ovules. CROWLEY (1957) est arrivé à la même conclusion à la suite d'une expérience de transfert de température, l'une des deux températures permettant seule la transmission par la graine du virus de la Mosaïque commune du Haricot : seul le transfert avant la floraison a influencé la transmission. Ce même type d'expérience a pû être

réalisé avec l'Orge infectée par le virus de la Mosaïque striée de l'Orge. (SINGH et Coll., 1960).

MEDINA et GROGAN (1961) ont précisé le rôle du pollen et des ovules en transmettant le virus de la Mosaïque commune du Haricot soit par le pollen soit par les ovules des plantes infectées en opérant des pollinisations croisées réciproques, plante saine x plante malade. La descendance F_1 résultant de la pollinisation de plantes résistantes par du pollen de plantes infectées, contenait un pourcentage élevé de plantules infectées quand le gène de résistance était récessif et aucune plantule infectée quand la résistance était dominante. Le pollen a transmis le virus à un plus grand pourcentage de plantules que l'ovule. Dans un autre système plante-virus, à savoir le virus de la Mosaïque de la Laitue chez Laitue, RYDER (1964) a trouvé que le pollen était au contraire moins efficace que l'ovule.

Ainsi le passage du virus au pollen ou aux ovules apparaît dans ces exemples comme une étape nécessaire à la transmission du virus par la graine. Notons que dans l'épidémiologie des maladies à virus, le pollen infecté peut jouer un rôle important de dissémination du virus non seulement à la descendance - par exemple dans des champs d'Orge infectés par le virus de la Mosaïque striée de l'orge (GOLD et Coll. 1954) - mais aussi dans la culture en place. C'est le cas au verger où peut se surajouter à l'infection de la graine, l'infection de la plante-mère elle-même. C'est ainsi que GEORGE et DAVIDSON (1963) et GILMER et WAY (1963) ont mis en évidence la dissémination sur les arbres du verger des virus du "Necrotic ring spot" et du "Prune dwarf" du Cerisier par le pollen.

Dans les exemples décrits plus haut, le passage du virus dans le pollen ou les ovules est nécessaire à la transmission par la graine. Réciproquement, quand la transmission par la graine est nulle, le pollen et les ovules sont-ils toujours sains ? BENNETT (1940) n'a pas retrouvé le VMT et le virus de la Mosaïque de la Betterave dans le pollen de Tabac et de Betterave et ces virus ne sont pas transmis par la graine à la plantule.

Cependant, de nombreux exemples infirment cette réciproque. BENNETT et COSTA (1961) ont mis en évidence le virus de la Mosaïque du Chénopode dans le pollen chez Atriplex Coulteri , hôte qui ne transmet pas ce virus par la graine - contrairement à ce qui se produit chez d'autres espèces d'Atriplex, chez Chenopodium quinoa, C. amaranticolor et C. murale.

Dans ce dernier cas, on relève un taux de transmission très élevé : 45 pour cent.

D'autres cas de non transmission par la graine de virus présents dans le pollen peuvent être cités : c'est encore le cas du virus de "Chlorotic leaf Spot " du Pommier sur Chenopodium quinoa et C. amaranticolor et aucune information de la transmission de ces virus dans les graines de ces plantes n'a été enregistrée (CADMAN, 1965). Il est intéressant, à la lumière des résultats ci-dessus, de revoir le cas des virus très infectieux, comme VMT dans le pollen de Tabac.

Les particularités anatomiques et cytologiques des gamètes pourraient influencer leur infection par le virus. En effet le temps de différenciation de la mégaspore et des microspores jusqu'à la formation de l'embryon peut être très court, d'environ un jour. (maheshwari , 1950), et si le virus n'a pas atteint ces cellules avant leur différenciation, il ne peut plus infecter le pollen entouré de membranes imperméables au virus. L'embryon lui-même est isolé. Or ceci est très probable à cause de la nature méristématique des tissus qui retarde la progression du virus.

Si le degré de ploïdie n'apparaît pas être une raison de la résistance ou de la sensibilité du pollen et des ovules, les effets métaboliques d'une méiose pourraient cependant être différents de ceux des mitoses dans d'autres tissus de la même plante (BENNETT, 1969).

L'influence du virus sur les caractères morphologiques et le pouvoir germinatif du pollen ont été étudiés pour les virus d'arbres fruitiers, à savoir la Sharka (PEJKIC et SUTIC, 1971) et divers virus d'arbres fruitiers à noyau (MARENAUD, 1965; LEMOINE , 1971).

Alors qu'il y a des cas de stérilité du pollen chez les virus transmis par la graine (RYDER, 1964), un effet correspondant n'a pas été enregistré pour la transmission par l'ovule.

CALDWELL (1952, 1962) a observé que le virus de l'Aspermie de la Tomate intervient dans la méiose de la méga et microspore bloquant la formation de la graine. Ce phénomène amène l'Auteur à généraliser cette explication de l'absence de transmission du virus par la graine.

3.2. Etude au niveau de la graine.

3.2.1. Immunité de l'embryon.

Quand on constate que les tissus autour de l'embryon sont infectés par le virus en concentration élevée et que l'embryon se développe aux dépens des tissus qui l'environnent, on s'étonne de la non infection de l'embryon. C'est le cas du VMT chez le Tabac.(TAYLOR 1962) et du virus du "Curly top " de la betterave chez la Betterave (BENNETT et ESAU 1936). TSCUCHIZAKI et Coll. (1971) ont démontré l'infection d'embryon au moment de la floraison, mais pas dix jours après la floraison de Phaseolus angularis et Vigna sinensis à la suite d'une inoculation par deux virus transmis par la graine. Bien que soient très plausibles les raisons les plus souvent citées, 1) l'impossibilité pour le virus de pénétrer les parois cellulaires de l'embryon,

2) l'absence de plasmodesmes entre l'embryon et les cellules autour (BENNETT, 1969), certains Auteurs ont aussi proposé une immunité de type biochimique de l'embryon. Selon CROWLEY (1959) le virus du "Southern bean mosaic" infecte l'embryon quatre jours après la floraison, mais pas sept et dix jours après floraison, ce qui indiquerait d'après cet Auteur, un développement rapide de la résistance de l'embryon contre le virus. Cependant la multiplication de ce virus chez l'embryon quarante trois jours après la floraison a été montrée par CHEO (1955); par ailleurs aucun métabolite de la croissance de l'embryon de Tomate en milieu de culture n'a eu d'effet inactivateur sur le VMT (CROWLEY , 1957).

3.2.2. Inactivation du virus dans l'embryon.

Quelques virus sans doute entrent dans l'embryon mais sont éliminés. Cette élimination semble plutôt se produire au cours du développement de l'embryon qu'au cours de la conservation des graines car SCOTT ,(1961), a obtenu 64 pour cent de transmission du virus de la Mosaïque striée de l'Orge, chez l'Orge après six ans et demi de conservation. Le travail de CHEO (1955) a aussi démontré le même fait, à savoir

que la concentration du virus du "Southern bean mosaic " augmente, chez l'embryon du Haricot, pendant un certain temps, puis retombe jusqu'au niveau zéro lorsque la graine est mûre. Le même virus est transmis d'ailleurs à un taux élevé par les graines immatures mais pas par les graines mûres. De même Mc DONALD et HAMILTON (1972) ont montré une absence du virus chez l'embryon trois jours après la maturation des gousses de haricots.

3.2.3. Présence d'inhibiteurs.

Des inhibiteurs d'installation du VMT ont été obtenus à partir de graines de Tabac, du virus "Southern bean mosaic " chez les graines de Haricots et du VMT et "Southern bean mosaic " virus chez les graines du Piment (DUGGAR, 1930, KAUSCHE, 1940 et CHEO, 1955, CROWLEY, 1955, FELDMAN, 1963) mais il n'y a aucune certitude qu'ils agissent in vivo dans les graines au cours de la germination. Le même problème se pose pour les cytokinines présentes dans les graines germées et dont l'effet inhibiteur sur l'infection virale est connu. On sait aussi que les graines contiennent de l'acide phytique et les modalités d'action du phytate de sodium en tant qu'inhibiteur d'installation du VMT ont été très bien étudiées par MAIA, (1967).

3.2.4. Evolution du virus au cours de la conservation de la graine.

La période pendant laquelle le virus se maintient dans la graine varie selon le virus, l'hôte, la localisation du virus et les facteurs d'environnement. JOHN et SOVA (1955) n'ont pas observé une grande perte du VMT chez la Tomate après trois ans de conservation. RAYCHAUDHURI (1952) a trouvé une très courte période du pouvoir infectieux, respectivement, 2 à 3 semaines pour deux souches du VMT chez la Tomate. Pour le même virus ALEXANDER (1960) a noté une chute rapide de pouvoir infectieux après la première année de conservation mais le virus était retrouvé après trois ans. TAYLOR et Coll. (1961) n'ont observé aucune plantule de Tomate malade après quatorze mois de conservation de la graine. Ils constataient même que le virus dans l'albumen est inactivé. Une période de conservation de neuf ans pour VMT était enregistrée par BROADBENT (1965). Chez le Tabac, le virus a été détecté après neuf mois de conservation chez les téguments et le tissu albumen + embryon, mais la présence du virus est devenue difficile à démontrer. (TAYLOR, 1962, POWELL et SCHLEGEL, 1970).

ont enregistré une perte de la transmission de 23 à 5 pour cent dans le cas du virus de la Mosaïque des Cucurbita après deux ans de conservation. Les tests avec le virus de la Mosaïque du Chénopode chez les graines du Chenopodium murale n'ont révélé aucune perte du pourcentage de transmission après une période de conservation de six ans et demi, et le pouvoir infectieux était conservé même après quatorze ans, tandis que dans l'extrait des feuilles la conservation du pouvoir infectieux est de deux à trois mois. (BENNETT et COSTA, 1961; VUITTENEZ, 1962; DIAS et WATERWORTH, 1967). Or, MAZJAD (1971) a conclu que le délai de la conservation des graines n'a pas d'influence sur la perte du virus de la Mosaïque du Dolique de Chine chez Vigna Sinensis. On trouve ainsi des virus qui se maintiennent très longtemps et d'autres qui perdent leur pouvoir infectieux au cours de la conservation de la graine.

Le virus Mosaïque commune du Haricot chez Haricot se maintient trois ans (NELSON, 1932).

Le V. "Necrotic ring spot" du Cerisier chez le Prunus pensysvanica : trois ans (FULTON, 1964).

Le V. "Ring spot " du Framboisier chez le Capsella bursa pasteris : six ans. (LISTER et MURANT, 1967).

Le V. "Southern bean mosaic " chez le Haricot : moins de sept mois (ZAUMEYER et HARTER, 1943).

Le V. "Curly top " de la Betterave chez la Betterave : deux mois (BENNETT et ESAU, 1936).

3.3. Etude au niveau de la plantule.

Le pourcentage de graines infectées n'est pas toujours une estimation valable du taux de transmission. La gravité des symptômes que présentent les jeunes plantules varie selon le système virus-hôte considéré. Dans quelques cas les symptômes sont souvent évidents même aux stades précoces. Dans d'autres cas, les symptômes sont masqués et sont révélés seulement par le test biologique. Par exemple, les symptômes de la Mosaïque du Chénopode chez Chenopodium murale sont souvent visibles sur les feuilles cotylédonaires (BENNETT et COSTA, 1961), alors que ce même virus reste à l'état latent dans les plantules de C. quinoa et C. amaranticolor

(DIAS et WATERWORTH, 1967). Les symptômes de la Mosaïque commune du Haricot sont évidents dans les premières feuilles trifoliées chez le Haricot (NELSON, 1932). Cependant POWELL et SCHLEGEL (1970) analysant par le test du pouvoir infectieux un lot de plantules, ont décelé 22 % de transmission du virus alors que 12 % seulement des plantules présentaient des symptômes. Plus intéressant encore est le cas des virus du type Ring Spot transmis par les Nématodes, qui passent souvent dans les plantules sans provoquer de symptômes (LISTER et MURANT, 1967), lorsque les plantes-mères forment de nouvelles feuilles d'apparence saine après avoir franchi le stade aigu de la maladie. Cette "guérison" est expliquée par un nouveau type de relation virus-cellule où la cellule contrôle la replication virale. LISTER et MURANT ont supposé que cet état de "guérison" est transmis aux plantules issues des graines de plantes-mères "guéries".

C - PROBLEMES A RESOUDRE.

Dès les débuts de la virologie végétale, ALLARD (1915), s'appuyant sur les premiers travaux sur le virus de la Mosaïque du Tabac, a souligné l'existence d'un mécanisme de barrière dans la transmission du virus par la graine de Tabac. Nous allons nous attacher à mieux définir cette barrière à la lumière des différents exemples que nous avons décrits, en considérant tour à tour les stades de la morphogénèse au cours desquels les différentes modifications anatomiques et physiologiques peuvent bloquer la progression du virus. C'est sur le Tabac infecté par le VMT que nous nous proposons d'étudier ce problème.

1. Ebauches florales.

Les méristèmes apicaux de racines (WHITE, 1936) et de tiges (LIMASSET et CORNUET, 1949) constitués de cellules à métabolisme très actif, ne contiennent que peu ou pas de virus. Par ailleurs, GRISON et Coll. (1961) ont montré que le déclenchement du processus floral bloque la replication du VMT chez N. glutinosa -le virus est présent dans certains tissus mais incapable de se multiplier -. MARTIN et Coll. (1967) ont tiré parti de ces deux observations en montrant qu'à partir de N. tabacum var. Samsun infecté, la culture in vitro des territoires méristématiques excisés depuis la phase d'initiation de la floraison jusqu'au stade de méristème floral présentant les premières ébauches de sépales, donne naissance à de petites plantes végétatives ne renfermant plus de VMT.

On peut alors émettre l'hypothèse que l'action inhibitrice conjuguée des deux facteurs que l'on vient d'indiquer sur la multiplication virale a pour effet de bloquer la progression du virus jusqu'aux ébauches florales dans le cas des complexes hôte-virus qui ne transmettent pas le virus par la graine.

Pour éprouver cette hypothèse, nous rechercherons donc le virus au niveau des pièces florales de Tabac infectées par le VMT.

2. Pollen et ovules.

Pour les hôtes qui ne transmettent pas le virus par la graine mais dans lesquels le virus a atteint les pièces florales, on est conduit à se demander si la méiose n'est pas le phénomène cellulaire responsable de la perte du virus.

Cette perte du virus au cours des divisions méiotiques a été en effet décrite par LAPIERRE et Coll. (1970) chez l'Ascomycète Ophiobolus graminis Sacc. On constate que les mycelium porteurs du virus PF ont une production d'ascopores très réduite par rapport aux mycelium sains. Ceci est à relier à l'effet du virus de l'Aspermie de la Tomate sur la méiose (CALDWELL, 1962); d'autre part les ascopores obtenues sont indemnes de virus.

Nous nous sommes donc proposé, dans l'éventualité où on trouve le virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) dans les pièces florales du Tabac, de rechercher ce virus après la méiose, dans le pollen au stade tétrade. Un résultat positif doit alors être suivi d'une investigation au niveau de la graine.

3. Graine.

Une étude de la présence et de la localisation du virus dans la graine peut apporter des éléments d'information qui complètent les résultats déjà recueillis.

La présence éventuelle du virus dans les différentes parties de la graine doit nous conduire à contrôler la viabilité des graines infectées et

à suivre le devenir du virus au cours de la conservation de la graine et au cours du développement de l'embryon.

4. Plantule.

Compte tenu des connaissances actuelles sur les relations hôte-virus, par exemple la participation de certaines polymérases de l'hôte à la replication du virus, (ASTIER -MANIFACIER et CORNUET, 1971 , KUO et AUGUST, 1972), on peut se demander si un organe jeune comme la plantule est capable de réaliser la replication virale ou permet cette replication sans qu'on le décèle à l'oeil par des symptômes.

L'examen de ces différentes hypothèses de travail doit nous permettre de situer de façon plus claire le stade physiologique qui est incompatible avec la transmission du VMT aux plantules de Tabac.

II - MATERIEL ET METHODES.

A - CHOIX DU COMPLEXE VIRUS-HOTE.

Nous avons utilisé le complexe hôte-virus suivant :
(VMT) Virus mosaïque du Tabac sur Tabac.

1. Choix du virus.

Le choix du virus repose sur la facilité avec laquelle on le détecte. Ceci suppose que le virus :

- ait un hôte hypersensible,
- puisse être facilement purifié,
- soit très antigénique pour permettre l'obtention d'un sérum de titre élevé.

Le VMT, Virus de la Mosaïque du Tabac, répond à ces exigences. En effet :

- au moyen de lésions locales provoquées par ce virus chez l'hôte le Nicotiana tabacum var. Xanthi nc., il est possible de le mettre en évidence.
- les méthodes de titrage du virus par voies physique ou biologique et sérologique sont bien définies.

La souche du VMT utilisée au cours de cette étude est celle qui produit la Mosaïqueverte. Avant son utilisation, cette souche a été multipliée sur Nicotiana tabacum var. Samsun avec transfert tous les deux mois, à partir de jeunes feuilles présentant des symptômes caractéristiques de Mosaïque. Nous n'avons pas observé de différence appréciable dans la taille des lésions locales provoquées par cette souche chez N. tabacum Xanthi. (Photo 1).

Lésions locales provoquées par la souche du VMT utilisé sur "Xanthi"

2. Matériel végétal.

Les graines saines et infectées utilisées dans cette étude sont celles du Nicotiana tabacum var. Samsun.

Un certain nombre de lots de graines provenant des plantes inoculées par VMT, est fourni par Melle AUGIER de MONTGREMIER.

Ces végétaux, ainsi que N. tabacum Xanthi, utilisés comme hôtes hypersensibles, sont cultivés en serre et pour chaque inoculation, les plantes utilisées sont choisies dans les lots homogènes, semés et rempotés à même date. La période d'éclairement quotidien de la serre est de l'ordre de douze heures. Les serres n'étant pas climatisées, les végétaux subissent des fluctuations de température relativement importantes. Nous avons également employé les graines de N. tabacum Xanthi mises à germer dans une chambre climatisée à 30°C avec une humidité de 70 pour cent et sous éclairement continu.

3. Inoculum et inoculation.

3.1. Préparation de l'inoculum.

La méthode de purification utilisée est la précipitation spécifique du virus par le polyéthylène glycol (PEG) selon GOODING et HEBERT (1967), que nous avons complétée d'un fractionnement en fonction du coefficient de sédimentation dans un gradient de densité de saccharose.

3.1.1. Technique de purification par le PEG.

Les différentes opérations de la purification peuvent être schématisées ainsi :

1. Feuilles de Tabac "Samsun". Broyage dans tampon phosphate monopotassique - dipotassique 0,5 M pH 7,2 et 1% 2 mercapto-éthanol dans les proportions 1g/1ml.

2. Rétention des débris dans une étamine et centrifugation du broyat 20 minutes à 5000 g. Culot éliminé

3. Surnageant
Addition goutte à goutte, en agitant, de n-butanol 8%.
Agitation du mélange encore 15 min.
Centrifugation 15 min. à 10,000 g. Culot éliminé

4. Surnageant.

Addition de 4% de PEG 6000

Agitation 15 min.

Centrifugation 15 min. à 10 000 g. Surnageant éliminé

5. Culot.

Repris dans tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 dans une proportion de 20 ml pour 100 ml d'extrait initial.

Suspension homogénéisée dans un "potter".

Centrifugation 15 min. à 10 000 g Culot éliminé

6. Surnageant.

Deuxième précipitation PEG 6000

Addition de 4% PEG + 4% chlorure de sodium.

Agitation 15 min.

Centrifugation 15 min. à 10 000 g. Surnageant éliminé

7. Culot

Repris dans tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 dans une proportion de 2 ml pour 100 ml d'extrait initial.

Suspension homogénéisée dans un "potter".

Centrifugation 5 min. à 10 000 g. Culot éliminé

8. Surnageant = suspension virale (blanche et opaque)

3.1.2. Centrifugation en gradient de densité

Les gradients discontinus de saccharose (10 - 40%) sont préparés avec la pipette. La solution la plus concentrée est placée d'abord, suivie par les autres en ordre de concentration décroissante. Le saccharose est dissous dans le tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2. 1 ml de suspension virale est déposé au sommet de chaque gradient. La centrifugation est réalisée dans un rotor SW 25 à 60.000 g durant 2 Heures. Les gradients sont analysés à l'aide d'un dispositif automatique "Isco" (lecture à 254 nm) qui permet de recueillir séparément les fractions intéressantes.

Dans tous les diagrammes nous avons observé un pic assez plat tout près du ménisque (Figure I) puis deux pics importants que nous appelons Pic I et Pic II.

Fig. 1. Analyse d'un gradient du VMT purifié par peg.
1/ Fraction I ; 2/ Fraction II.

Les fractions sont recueillies séparément et soumises à une centrifugation de 90 min. à 100.000 g (Spinco Rotor 40) pour concentrer le virus et éliminer le saccharose. Le culot de chaque fraction est repris dans un faible volume du tampon phosphate 0,01 M pH 7,2. La fraction correspondant au pic voisin du ménisque n'a révélé, au microscope électronique, aucune particule virale tandis que les particules virales sont observées dans les fractions correspondant aux pics I et II : celles du pic I apparaissent comme des particules virales cassées.

Nous avons utilisé la fraction correspondant au pic II pour nos études sérologiques.

3.1.3. Dosage spectrophotométrique

Nous avons dosé la suspension virale avec un spectrophotomètre (Beckman). Pour des dilutions de VMT purifié dans les conditions décrites, on peut établir une corrélation entre la concentration en virus des suspensions et la densité optique de ces mêmes suspensions, à 265 nm. (TAKAHASHI, 1961). La concentration en virions d'une suspension standard a été définie par le dosage de l'azote protéique, et par la détermination du poids de matière sèche d'une fraction aliquote. Ces dosages permettent de relier une concentration de VMT. de 320 µg par millilitre à une densité optique de 1 à 260 nm.

Le virus en suspension ainsi dosé, nous avons obtenu un rendement à peu près de 1 g VMT pour 350 g de feuilles.

3.2. Inoculation.

Les plantes de Tabac Samsun ayant quatre à cinq feuilles sont choisies pour l'inoculation. L'inoculation est réalisée par un léger frottement à l'aide d'une éponge trempée dans l'inoculum sur des feuilles préalablement poudrées avec du carborundum. Les témoins sont inoculés pareillement avec du tampon phosphate.

B - ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX.

On étudie le pouvoir pathogène d'une suspension de VMT en inoculant sur des feuilles des Nicotiana tabacum Xanthi qui réagissent par des lésions nécrotiques à 20-25°, au bout de deux à trois jours.

1. Préparation de l'inoculum.

Nous avons utilisé cette méthode pour rechercher les particules infectieuses au niveau

1/ de l'ébauche florale et des différentes parties des pièces florales
2/ du pollen
3/ des feuilles des pieds-mères portant les graines fécondées artificiellement
4/ des graines à différents temps de conservation
5/ des plantules issues des graines saines et infectées.

En outre, ce test a été appliqué pour étudier la nature inhibitrice des broyats de plantules.

Le broyage a été effectué dans un mortier ou un tube à hémolyse auquel peut s'adapter un piston de "potter". Les précautions indispensables contre toute contamination d'un échantillon à l'autre ont été prises, au niveau du matériel utilisé pour le broyage et au niveau des échantillons étudiés. Les mortiers sont tout d'abord nettoyés par un mélange de teepol et d'hypochlorite de sodium, puis rincés abondamment à l'eau. Ils sont ensuite flambés à l'alcool, refroidis et rincés à l'eau. Le potter est lavé soigneusement à l'alcool et rincé à l'eau. Les pinces, les aiguilles, les scalpels utilisés pour le prélèvement d'échantillons ou pour la dissection ont été flambés à l'alcool.

Nous avons utilisé systématiquement le milieu d'extraction tampon phosphate, 0,01M pH 7,2 avec 0,4% de mercaptoéthanol qui conserve le pouvoir infectieux.

2. Inoculation.

L'inoculation a été réalisée à l'aide d'une éponge trempée dans l'inoculum réparti par un léger frottement sur des feuilles entières ou des demi-feuilles sur lesquelles a été préalablement pulvérisé du carborandum. Pour de faibles volumes d'inoculum, l'inoculation a été effectuée par léger frottement de l'épiderme supérieur avec la pipette qui a servi à déposer l'inoculum. On change de pipette pour chaque inoculum à doser, pour éviter toute contamination. On rince les plantes à l'eau après l'inoculation.

3. Interprétation des résultats.

Un nombre minimum de huit feuilles est utilisé dans nos essais pour chaque échantillon. Les lésions locales sont comptées trois à quatre jours après l'inoculation. Le nombre de lésions locales est une estimation relative du pouvoir infectieux des différents échantillons. Toutefois il y a des difficultés d'ordre théorique et pratique dans une telle estimation. (MATTHEWS, 1970). Néanmoins, dans une expérience bien planifiée, en tenant compte de la variation de réponse des différents niveaux de feuilles d'une part, et en contrôlant l'efficacité de l'inoculation par rapport à un inoculum standard, on peut, après analyse statistique, apprécier des différences d'environ 10% entre deux préparations.

Pour comparer le nombre de lésions locales apparues sur les feuilles témoins et traitées, nous avons utilisé le "F test".

C - ETUDE SEROLOGIQUE.

1. Préparation du sérum.

Le virus de la Mosaïque du Tabac (VMT), purifié par le polyéthylène glycol comme décrit ailleurs, est dilué dans le sérum physiologique pour l'immunisation du lapin.

Deux lapins (mâles, race Fauve de Bourgogne) N°s 24 et 28 ont reçu une première injection intramusculaire avec 4 mg de virus émulsionné avec l'adjuvant du Freund incomplet dans la proportion 1 :1. La deuxième injection intramusculaire a suivi, après dix jours, avec 6 mg de virus plus adjuvant. Après une période de repos de un mois et demi, une troisième injection, cette fois intraveineuse, est faite avec quatorze mg du virus. Une semaine après cette dernière immunisation, les prises de sang de deux lapins ont donné un titre de 2000 pour le sérum du lapin N° 24 et 300 pour le lapin N° 28; l'estimation du titre étant faite par la précipitation en anneau (Ring test).

20 ml du sang du lapin N° 24 est prélevé par une seringue par la voie intraveineuse et le sérum récolté après une période de repos d'une nuit à + 4°C. Toutes nos études avec le sérum anti-virus de la Mosaïque du Tabac (sérum VMT) font référence à ce sérum ayant pour titre 2000.

Test de détection d'immunoglobulines antiprotéine de Tabac.

Le sérum est ensuite testé par double diffusion en agar pour la présence d'anticorps antiprotéines de Tabac.

Le jus brut des feuilles de Tabac "Samsun" sain clarifié par centrifugation à 5000 g pour 15 mn, est mis, à différentes dilutions (5, 10, 50, 100, 500) en présence de sérum non dilué et dilué (2, 4, 8 et 16).

Aucune réaction positive n'a été observée.

2. Tests sérologiques.

Les différents tests utilisés selon les différents besoins techniques sont les suivants:

2.1. Précipitation en anneau. ("Ring test")

Ce test est utilisé principalement pour le titrage des antisérums. Nous l'avons aussi employé pour connaître le titre des immunoglobulines (IgG) purifiées pour connaître la dilution limite avant de sensibiliser le latex.

Dans les tubes de 3 mm. de diamètre, on place la suspension virale à une concentration où la précipitation est rapide (100µg/ml VMT) au fond du tube. Nous rendons la suspension virale plus dense en ajoutant du saccharose à 50 mg/ml. De ce fait un ménisque peut être formé en plaçant doucement la dilution choisie du sérum au-dessus. La dilution du virus et du sérum est faite dans l'eau physiologique. Les tubes sont laissés à la température du laboratoire et le précipité antigène - anticorps est contrôlé après 30 mn. La plus grande dilution du sérum donnant un anneau visible à l'interphase (Photo 7) est le titre du sérum.

Photo 2. Précipitation en anneau d'une série de dilution du sérum.

La sensibilité de cette méthode par rapport à la microprécipitation sur lame est dûe à une lecture plus facile dans un faisceau lumineux sur fond noir. Cette méthode n'apporte aucun renseignement sur le plan qualitatif (présence de différents anticorps dans un même sérum). Aussi la compète-t-on par la méthode de contrôle en agar que nous allons décrire maintenant.

2.2. Double diffusion en agar.

WRIGHT et STACE SMITH (1966) dans une étude comparative sur l'efficacité des tests de précipitation en tube et précipitation en gélose (double diffusion en agar) sont arrivés à titrer respectivement 0,5 à 4 µg/ml et 16 à 256 µg/ml d'antigène.

La réaction de double diffusion s'effectue sur lames préparées avec l'appareil LKB, ou dans une boîte de Pétri (MANSI, 1958). Le support est un gel à 1 pour cent (Bacto-agar Difco) réalisé avec de l'eau distillée contenant du chlorure de sodium 0,15 M (gélose physiologique).

Une disposition circulaire des réservoirs, représentée sur la figure 2 est adoptée.

Fig. 2. Disposition des réservoirs de double diffusion en agar.

Le schéma de base comprend huit réservoirs périphériques destinés aux antigènes, régulièrement disposés autour d'un réservoir central contenant le sérum; il est ainsi possible de rechercher la présence de virus dans un grand nombre de plantules en utilisant peu de sérum. Deux schémas identiques figurent sur chaque lame porte-objet, et six lames sont groupées dans un même chassis.

On laisse les antigènes et les anticorps diffuser pendant vingt quatre heures en chambre humide avant de faire la lecture. Pour éliminer les protéines qui n'ont pas réagi, les lames présentant des arcs de précipité sont lavées dans l'eau physiologique pendant une journée avec deux changements de bain de lavage, desséchées partiellement, puis colorées dans une solution de noir amide avant dessiccation complète.

Nous avons utilisé ce test uniquement pour contrôler les anticorps antiprotéines du Tabac dans du sérum. En raison de la faible diffusion des particules hélicoïdales dans la gélose, nous avons dû utiliser pour le VMT, l'immunoélectrophorèse.

2.3. Immunoélectrophorèse.

La technique de l'immunoélectrophorèse en gélose, selon GRABAR et WILLIAMS, (1955), permet, dans une première étape, de séparer les différents antigènes en fonction de leur charge électrique et de les révéler dans une deuxième étape en réalisant la réaction antigène-anticorps.

Nous avons utilisé l'appareil POLYPHOR des Etablissements CHAIX. Le réservoir de l'appareil est rempli avec de l'eau froide (effet refroidissant sur la plaque de verre) et placé sur un plan horizontal. Sur la plaque de verre (18 x 13 cm) est coulée une gélose à 1,2 pour cent dans un tampon véronal-véronal sodique de 0,05 M pH 8,6 avec merthiolate 1/5000 de façon à obtenir une couche uniforme d'environ 3 - 4 mm d'épaisseur. Quand la gélose est prise les réservoirs sont découpés à l'emporte-pièce, (Figure 3).

Figure 3. Schéma d'immunoélectrophorèse.

L'égalité des niveaux du tampon véronal 0,1 M pH 8,6 dans les deux bacs est contrôlée. Le contact électrique, entre la couche de gel et le tampon dans le bac, est assuré par des ponts de gélose.

Après avoir mis un peu de gélose au fond des réservoirs, on introduit l'antigène ou l'anticorps selon le schéma expérimental. Une

tension continue de 110 V sous un ampérage inférieur à 30 mA est appliquée entre les électrodes et on laisse la séparation électrophorétique des antigènes se poursuivre pendant deux heures.

A la fin de l'électrophorèse, la plaque est retirée et des canaux sont découpés parallèlement à l'axe de migration électrophorétique. On introduit le sérum dans les canaux dont le fond a été recouvert par une mince couche de gélose. La plaque est alors placée dans une enceinte close humide à 4°C. pendant environ quatre jours. Au cours de l'opération, les antigènes séparés par électrophorèse et les anticorps de l'antisérum diffusent dans la couche de gel. Lorsque les antigènes rencontrent leurs anticorps spécifiques, sous une certaine concentration relative, il se forme des précipités opalescents disposés en forme d'arcs. Ces précipités sont observés à l'oeil nu ou agrandis avec un agrandisseur photographique.

Pour photographier ou conserver la plaque, la couche de gel est desséchée et le précipité est coloré. Il est cependant nécessaire que l'excédent de protéines (protéines n'ayant pas participé à la réaction) soit d'abord éliminé par lavage à l'aide d'une solution de NaCl à 1 pour cent pendant vingt quatre heures. La plaque est retirée du bain de lavage, rincée et desséchée après avoir été couverte d'un papier buvard trempé à l'eau, sur lequel viennent cristalliser les sels minéraux. Quand le gel est desséché, on retire le papier buvard et la plaque est immergée dans le bac à coloration, pendant 20 min.

Solution de coloration :

Rouge Ponceau 1 g

Acide Acétique à 1 N 450 ml

Acétate de sodium à 0,1 N 450 ml

Glycérol pur 100 ml

On transfère la plaque au bain du rinçage d'acide acétique à 2 pour cent, contenant 8 pour cent de glycérol. L'opération est répétée dans deux bains successifs (de cette façon la durée du rinçage totale est de 50 minutes).

Nous avons aussi utilisé le dispositif d'immunoélectrophorèse décrit par DEVERGNE et CARDIN, (1967), SPIRE (1967), avec l'appareillage LKB où le gel est déposé sur des lames de verre pour microscope. Cela permet d'analyser plusieurs échantillons et la coloration et le

le lavage peuvent être faits en série. La solution de coloration est le noir amide 10 B à 6 g/l dans un mélange d'alcool méthylique, d'acide acétique et d'eau dans les proportions 45 : 10 : 45.

Nous avons utilisé cette même méthode pour caractériser les gamma-globulines dont nous avons entrepris la purification. Les protéines sériques du lapin sont révélées par un sérum cheval antilapin qui nous a été fourni par Melle AUGIER de MONTGREMIER.

2.4. Immunofluorescence.

Principe de la technique

C'est une technique basée sur le marquage des réactifs immunologiques - plus souvent l'anticorps - par un fluorochrome, par exemple l'isothiocyanate de fluorescéine qui est fixé sur la globuline anticorps par une liaison covalente stable au cours de la réaction immunologique.

L'immunofluorescence permet :

- d'identifier un antigène à l'aide d'un immunsérum connu;
- de révéler la localisation de cet antigène dans un tissu donné.

L'utilisation de cette technique dans cet objectif suppose que l'anticorps puisse atteindre facilement le site de l'antigène; or la membrane cellulosique est imperméable aux anticorps.

Ceci nous a donc conduit, soit à faire des coupes de tissus, soit à tenter de transformer les tissus considérés, en une suspension de protoplastes.

Comme nous le verrons plus loin, l'utilisation de l'immunofluorescence suppose que les tissus ne présentent pas de fluorescence propre que l'on puisse confondre avec la fluorescence émise par la fluorescéine.

Nous verrons que le matériel végétal est de ce point de vue, très mauvais, en raison de sa fluorescence propre.

La technique d'immunofluorescence, selon COONS, a été appliquée avec un succès tout relatif aux virus végétaux par NAGARAJ (1965), qui a utilisé la méthode directe pour suivre l'infection du VMT in situ dans les plantes atteintes par ce virus.

Nous avons utilisé la méthode directe pour mettre en évidence le VMT dans le protoplaste de mésophylle et du pollen. Nous l'avons

aussi appliquée à un certain nombre de coupes de graines de Tabac et de boutons floraux.

Etalement des antigènes.

Les protoplastes de Tabac sain et infecté sont fixés au formol 0,1 pour cent. Deux à trois gouttes de préparation bien homogénéisée sont disposées dans les deux cercles de diamètre 8 à 10 mm, et distants de 20 mm, gravés dans une lame propre et dégraissée. Un léger chauffage juste avant l'usage, du côté qui doit recevoir le dépôt, permet à la préparation de mieux adhérer sur la lame.

Les étalements sont alors lavés deux fois dans de l'eau physiologique tamponnée.

Les coupes de graines sont fixées sur les lames à l'aide d'eau albuminée. L'étalement des coupes, le déparaffinage et la réhydratation sont faits selon la méthode classique histologique. La fixation des coupes est réalisée par trempage dans l'acétone froide (+ 4°C) pendant 5 mn et rinçage deux fois dans de l'eau physiologique tamponnée.

Formule des réactifs.

Eau physiologique tamponnée pH 7,2 (0,01 M PO_4^-)

NaCl	8g
$H\,Na_2\,PO_4\,12\,H_2O$	2,7 g
$H_2Na\,PO_4\,2\,H_2O$	0,4 g
eau distillée q.s.	1litre

Glycérine tamponnée pH 7,6 (0,1 M PO_4^-)

$H\,Na_2\,PO_4\,12\,H_2O$	3,2 g
$H_2\,Na\,PO_4\,2\,H_2O$	0,15 g
eau distillée q.s.	100 ml
glycérine bidistillée	50 ml

Immunofluorescence directe.

Dans la technique d'immunofluorescence directe, l'anticorps contre l'antigène à révéler, est couplé avec la fluorescéine et donc, il est nécessaire de préparer le conjugué globulines-fluorescéine de chaque système à étudier. Nous avons préparé parallèlement deux conjugués; l'un contre le virus de la Mosaïque du Tabac et l'autre contre le virus de la Mosaïque Jaune du Navet.

a - Préparation du conjugué IgG MT - fluorescéine.

Pour que la réaction d'immunofluorescence soit spécifique, il est nécessaire que

1°/ l'anticorps soit spécifique

2°/ un certain degré de marquage de la molécule d'anticorps par les molécules de fluorescéine ne soit pas dépassé. Pour la virologie végétale un rapport de deux à trois molécules de fluorescéine par molécule d'anticorps est suggéré. Nous décrivons dans les résultats expérimentaux la purification d'anticorps. Ici nous précisons

1/ le couplage de l'anticorps avec la fluorescéine

2/ la séparation de la fluorescéine non couplée

3/ la détermination du rapport fluorescéine/protéine et

4/ l'estimation du titre du conjugué.

1/ Couplage globulines-isothiocyanate de fluorescéine

Un dosage des protéines contenues dans la solution de globulines purifiées est fait par spectrophotométrie à 280 nm, en employant comme référence une solution de γ globulines humaines à 0,7 mg/ml, nous avons dosé 130 mg de protéines. Une solution d'isothiocyante de fluorescéine (produit commercial de B.D.Mérieux) à 5 mg/ml dans du bicarbonate de sodium à 1 M. est préparée et ajoutée aux globulines dans la proportion de 15 µg de fluorescéine par mg de protéine calculée. Le pH est alors amené à 9,25 par addition de carbonate de sodium à 1 M. On laisse évoluer la réaction à la température du laboratoire à l'obscurité pendant trois à quatre heures.

2/ Séparation de la fluorescéine non couplée par chromotographie sur une colonne de Sephadex G. 50.

8 g de Sephadex G 50 à granulation fine est saupoudré en pluie dans 150 ml de sérum physiologique tamponné à pH 7,2. Après le gonflement du gel une décantation est faite pour enlever les grains fins non sédimentés. La pâte fluide est alors versée dans une colonne de verre de diamètre 25 mm et 250 mm de hauteur, dont la base est garnie d'un petit tampon de laine de verre et la tubulure inférieure fermée à l'aide d'un caoutchouc et d'un bouchon. Lorsque le séphadex est sédimenté, l'excès de tampon est écoulé, on lave la colonne avec du sérum physiologique tamponné, et lorsque le liquide affleure le haut de la colonne,

on verse avec précaution le mélange réactionnel. On recueille la solution de conjugué caractérisée par une bande colorée qui se sépare facilement de la fluorescéine libre. Ainsi nous avons recueilli 15 ml de conjugué fluorescent.

Nous avons contrôlé le conjugué avant son emploi en déterminant directement le nombre de molécules de fluorescéine par molécule de globuline.

3/ Détermination du rapport fluorescéine/protéine.

Dosage de la fluorescéine

La densité optique du conjugué dilué au 1/50 dans de la soude 0,1 N est déterminée à 493 nm et la quantité de fluorescéine calculée par reférence à la densité optique de 7 µg de fluorescéine combinée à des globulines (0,356). La quantité de fluorescéine ainsi calculée est de 0,348 mg.

Dosage des protéines

par la méthode FOLIN-CIOCALTEU.

Dans un tube on introduit 1 ml de conjugué dilué au 1/100. 1 ml d'eau distillée bouillie, 6 ml d'une solution CO_3Na_2 à 12,5 g/100ml. et 1 ml solution SO_4 Cu à 0,1/100 ml.

Dans un deuxième tube, un "blanc" est préparé en introduisant 2 ml d'eau distillée et les mêmes quantités de réactif que dans le premier tube.

Quatre réactifs sont bien mélangés et laissés à la température du laboratoire. Après une heure, on ajoute goutte à goutte en mélangeant constamment 1 ml de réactif de FOLIN dilué au 1/3 avec de l'eau distillée. Après 20 à 30 min. à la température du laboratoire, la densité optique des tubes est mesurée à 750 nm; la différence avec le blanc donne la densité optique dûe à la protéine. Une courbe de référence de la densité optique de la coloration donnée par une solution connue de sérum albumine bovine permet de calculer la quantité de protéine contenue dans le conjugué. En multipliant le rapport pondéral de quantité de $\frac{\text{fluorescéine}}{\text{protéine}}$ calculé par 0,4 1 pour les convertir en rapport moléculaire, nous avons obtenu un conjugué fluorescent renfermant 3,2 mol. de fluorescéine par molécule de globuline.

Le conjugué fluorescent est concentré par dialyse contre une solution de carbowax 4000 à 10 pour cent dans de l'eau physiologique tamponnée. On arrête la dialyse lorsque le volume est inférieur

à 5 ml et le titre d'anticorps est alors estimé par la précipitation en anneau. La dilution limite est d'environ 500. Le conjugué est conservé après addition d'un volume égal de glycérine distillée à l'obscurité à + 4° C.

b - Exécution de la technique.

On fait agir directement le conjugué sur les coupes ou sur les protoplastes. On élimine l'excès de sérum et l'examen est fait au microscope à fluorescence. Ces opérations sont réalisées à la température du laboratoire. Les risques de fixation non spécifique des globulines marquées sont diminués par étalement des coupes sur l'eau albuminée. L'examen de la fluorescence est effectué dans un milieu glycérine tamponné à pH 7,6.

Les opérations sont schématisées ainsi:

1. Fixation des étalements d'antigènes à l'acétone ou au méthanol et lavage à l'eau physiologique tamponnée (tampon véronal - véronal sodique pH 8,6).

2. Incubation des étalements avec du conjugué dilué au 1/50 avec de l'eau physiologique pendant 30 min. à l'abri des poussières dans une enceinte close, humide.

3. Lavage trois fois avec de l'eau physiologique.

4. Montage des étalements dans de la glycérine tamponnée et observation au microscope entre lame et lamelle.

Les témoins que nous avons employés régulièrement, sont :

1. Incubation des étalements avec de l'eau physiologique tamponnée.

2. Incubation avec des IgG anti-virus de la Mosaïque Jaune du Navet couplés à la fluorescéine.

3. Préparation saine du système étudié.

Dans notre expérience l'observation a été faite avec un microscope à fluorescence Nachet ayant comme source lumineuse une lampe Quartz Osram émettant dans le bleu. L'appareil est muni de filtres interférentiels adaptés à l'excitation de la fluorescéine.

Les photographies ont été réalisées en 400 ASA avec l'émulsion couleur EKTA CHROME 160 ASA lumière du jour.

2.5. Détection de l'antigène au moyen d'enzymes marqueurs.

Des anticorps marqués avec des enzymes peuvent être utilisés pour la détection d'antigène. (AVRAMEAS - Cours sur la purification et le marquage d'anticorps - Institut Pasteur).

Cette technique consiste à établir une liaison covalente entre une enzyme et les IgG, ce qui permet de révéler l'anticorps par une réaction cytochimique spécifique de l'enzyme employée. La réaction cytochimique, selon la technique de GRAHAM et KARNOVSKY, aboutit à un produit insoluble dans les milieux physiologiques, coloré ou dense aux électrons. Ainsi le marquage à l'enzyme permet la localisation de l'antigène au moyen du microscope photonique et électronique.

Nous avons utilisé cette technique pour compléter l'immunofluorescence et surtout ne pas être gêné par la fluorescence naturelle dite primaire de notre matériel d'étude, ce qui est le cas dans la deuxième technique.

Nous avons utilisé les anticorps cheval anti IgG lapin marqués à la peroxydase fournie par l'Institut Pasteur. Les échantillons étudiés sont incubés dans un premier temps avec les IgG-MT lapin marqués par la fluorescéine (technique directe de repérage du VMT); dans un deuxième temps ils sont incubés avec un sérum de cheval anti IgG lapin couplé à la peroxydase. Cette technique indirecte de repérage du VMT permet de recouper les résultats de la technique directe. La présence de peroxydase endogène dans le matériel végétal pourrait fausser les résultats. Donc, une détection et une inhibition préalable de l'activité peroxydase endogène sont indispensables. Ceci a été réalisé comparativement à l'aide d'un mélange du méthanol-ferricyanure-acide acétique comme décrit par STRAUS (1971) et de méthanol pur. Le méthanol pur nous a donné les meilleurs résultats. La technique du marquage est schématisée ainsi :

1° - Les coupes et les protoplastes fixés sur lames font un séjour pendant cinq minutes dans du mélange méthanol-ferricyanure-acide acétique ou dans le méthanol pur.

2° - lavés deux à trois fois dans du sérum physiologique tamponné.

3° - incubés avec des IgG lapin anti-MT marqués (au 1/50è) ou non-marqués par la fluorescéine pendant 30 mn (au 1/100 è).

4° - lavés deux à trois fois dans du sérum physiologique tamponné.

5° - incubés avec des IgG anti-lapin marqués à la peroxydase au 1/50 è pendant 1 h.

6° - lavés deux fois dans du sérum physiologique tamponné.

7° - incubés pendant 10 mn avec une solution de 5 mg diaminobenzidine dans 10 ml tampon Tris 0,1 M. pH 7,4 et 4 gouttes d'eau oxygénée (technique de GRAHAM et KARNOVSKY). Au cours de ce temps, la réaction se passe ainsi :

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxydase}} H_2O + 1/2\ O_2 + \underset{\text{(soluble et incolore)}}{\text{Diaminobenzidine}}$$

$$\text{Diaminobenzidine} \longrightarrow \underset{\text{(insoluble coloré)}}{\text{Produit oxydé}}$$

8° - rincés à l'eau distillée, montés dans de la glycérine tamponnée et observés entre lame et lamelle au microscope à l'aide d'une lumière ordinaire.

Les témoins de cette expérience sont :

1. Les échantillons sains.

2. Les échantillons non fixés au méthanol ou méthanol-ferricyanure- acide acétique.

3. Incubation avec du sérum physiologique tamponné au lieu des IgG homologués.

4. Incubation avec des IgG hétérologues comme IgG - TY dans notre système MT.

Pour une conservation permanente des coupes soumises à l'immunofluorescence ou immunoperoxydase, nous avons utilisé un montage dans un milieu synthétique, l'elvanol.

2.6. Test au latex.

Pour améliorer la détection du virus nous avons adapté à notre problème une méthode d'agglutination passive présentant une résolution élevée. L'anticorps purifié est adorbé sur des particules inertes de polystyrène latex. Ce test a été utilisé pour la première fois en sérologie animale(SINGER ,1956).

En utilisant la méthode du test au latex pour détecter le virus X chez le Tabac et la Pomme de terre, JERMOLJEV et ALBRECTCHEVA (1965) ont trouvé que ce test a une sensibilité huit fois supérieure à celle de la microprécipitation sur lame. De même BOZICEVICH et Coll. (1964) ont réussi à mettre en évidence le virus jusqu'à la dilution limite de 0,15 µg/ml .

Dans une étude comparative de tests sérologiques,ABU SALIH et Coll. (1968)ont constaté que le test à la bentonite (support inerte jouant le même rôle que le latex) est deux à cinq fois plus sensible pour les virus à symétrie hélicoïdale, et dix à vingt fois plus sensible pour les virus isométriques par rapport à la précipitation en tube. La concentration minimale du virus mis en évidence était 2,6 µg/ml avec le test à la bentonite.

Cependant, BERCKS, BERCKS et Coll.(1967, 1969) ont constaté une augmentation de la sensibilité du test au latex et le test à la bentonite trois cent à mille fois supérieure à celle de la microprécipitation sur lame et double diffusion en gélose. VUITTENEZ et KUSZALA (1970) ont observé une nette amélioration de la détection du virus chez la Vigne avec le test au latex. Etudiant la résolution du test au latex sensibilisé par les IgG purifié selon COHN et Coll. AUGIER de MONTGREMIER et Coll. (1972) sont arrivés à titrer 0,34 µg/ml du virus de la Mosaïque du Tabac ,

Ce test a souvent été utilisé dans nos essais avec les plantules de Tabac provenant des graines saines et infectées.

Comme le recommande BERCKS (1969) nous avons utilisé les fractions IgG purifiées à partir des sérums antiVMT et anti CMV. L'isolement de cette fraction IgG a été adapté à notre matériel et sera décrit dans le chapitre : Résultats expérimentaux.

On utilise une suspension de latex (0,8 µ B.D.MERIEUX) diluée au 1/15 è dans du sérum physiologique. Ce mélange est directement utilisé pour le test comme décrit par AUGIER de MONTGREMIER (1970) ou le mélange est lavé deux à trois fois avec le tampon Tris-HCl pH 7,2 et 0,02 pour cent polyvinyl pyrrolidone pour enlever l'excès d'anticorps non fixés, comme décrit par BERCKS (1967). Les différents procédés pour la sensibilisation du latex selon BERCKS (loc. cit.) sont les suivants:

1°/ Sérum dilué avec tampon Tris-HCl, 0,05M, pH7,2 à une dilution deux fois moins grande que la dilution limite est mélangé avec un volume égal de latex.

2°/ Agitation 30 min., température du laboratoire, centrifugation 30 min., 5000g.

3°/ Culot blanc dissous dans le tampon Tris HCl et O,02 pour cent polyvinylpyrrolidone. Le volume du tampon pris est égal au sérum dilué. Centrifugation 30 min., 5000 g.

4°/ Culot dissous comme précédemment.
Centrifugation 30 min., 5000 g.

5.°/ Culot blanc dissous comme ci-dessus.
Merthiolate 1/5000 est ajouté au latex sensibilisé et conservé à + 4°C.

La dilution de l'antigène et de la fraction IgG est faite dans un tampon Tris - HCl, pH, 7,2 ; 0,1 M.

Sensibilisation du latex :

Le latex est sensibilisé en mélangeant un volume de latex dilué au 1/15 à un volume égal de IgG purifiée et ramenée à une dilution deux fois plus faible que la dilution limite, déterminée par le test du précipité en anneau. Ce mélange est incubé en présence de 0,02 % de polyvinyl-pyrrolidone pendant trente minutes, à la température du laboratoire, en agitant fréquemment.

Exécution du test :

On fait une dilution d'antigène pour ne pas se tromper de phénomène de zone. On l'effectue dans les alvéoles des plaques de Kline (plexiglass ou plastique contenant huit rangées de dix, douze alvéoles de 1,5 cm de

diamètre) à raison de 0,5 ml d'antigène, puis on ajoute 0,2 ml de latex sensibilisé. Les plaques sont agitées par va et vient pendant 15 mn. pour bien mélanger les réactifs. Les témoins de la réaction sont :

- une dilution de virus purifié indiquant que l'IgG s'est bien liée au latex;
- le latex non sensibilisé plus l'antigène étudié, indiquant les agglutinations non spécifiques, ainsi que les trois témoins suivants;
- la latex non sensibilisé plus le tampon;
- la latex sensibilisé plus le tampon;
- le latex non sensibilisé plus les IgG.

La première lecture est faite dans un faisceau de lumière à l'oeil nu ou à l'aide d'une simple loupe à main. La deuxième lecture suit après une agitation supplémentaire de 10 min.

D - TECHNIQUES DIVERSES.

1. Coupes à la paraffine.

Pour localiser l'antigène in situ par la méthode d'immunofluorescence nous avons effectué les coupes des bourgeons et des graines inclus dans la paraffine (Cytoparaffine).

Les bourgeons sont fixés directement par un mélange de formol acide acétique - alcool (FAA) tandis que les graines sont réhydratées par trempage dans 10 pour cent de saccharose pendant une nuit et ensuite fixées par FAA. Les échantillons sont ensuite deshydratés dans une série de bains d'alcool éthylique à

50 % 2 h.
70 % 4 h.
80 % 24 h.
85 % 24 h.
90 % 24 h.
95 % 2 h.

et 100 % alcool isoamylique 30 min. deux fois et infiltrés avec la paraffine fondue mélangée avec un volume égal d'alcool isoamylique. L'alcool est ensuite éliminé par deux à trois changements de paraffine

pure et inclus définitivement dans la paraffine. Les coupes de 10 µ d'épaisseur sont faites avec un microtome ordinaire. Les coupes sont étalées à l'aide d'eau formolée sur des lames propres, dégraissées et enduites d'eau albuminée. Les lames avec les coupes sont laissées à 37°C dans une étuve pendant 48 heures avant le déparaffinage.

Nous avons aussi adopté la série de deshydratation décrite par JENSEN (1962) et nous l'avons complétée d'une infiltration de collodion à 1 pour cent avec du méthylbenzoate. La paraffine mélangée au toluène est alors infiltrée dans les tissus, puis le second bain est constitué de paraffine pure. Les tissus sont alors inclus définitivement.

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Principe.

La séparation des protéines par électrophorèse en gel de polycrylamide en présence d'un détergent anionique(sodium lauryl sulfate)dépend du poids moléculaire de leurs chaînes polypeptidiques.

Nous avons utilisé cette technique pour analyser les extraits de plantules en comparaison avec le virus purifié dans le but de caractériser la spécificité de la réaction dans le test au latex.

La technique utilisée est celle décrite par WEBER et OSBORNE (1969).

Préparation de la protéine.

Des extraits de plantules clarifiées par le chloroforme sont dénaturés à l'eau bouillante pendant 2 mn 1/2 avec 0,01 M tampon phosphate pH 7,0 contenant 1 % lauryl sulfate de sodium (SLS) et 1 % de mercaptoéthanol.

Préparation du gel.

Une solution de 10 % acrylamide composée de 11,1 g d'acrylamide et 0,3 g de méthylènebisacrylamide dans 50 ml d'eau distillée est préparée. 7,5 ml d'un tampon de gel contenant 51, 9 g de Na_2HPO_4 12 H_2O, 8,6 g de NaH_2PO_4 2 H_2O et 2 g SLS par litre est mélangé avec 6,75 ml de solution acrylamide diluée deux fois et filtrée.

Après le dégazage du mélange, 0,75 ml d'une solution de persulfate d'ammonium fraîchement préparée (15 mg par ml) et 0,02 ml de N, N, N', N - tétraméthyléthylènediamine sont ajoutés. Huit tubes de verre (10 cm x Ø 6 mm) préalablement lavés et séchés à l'étuve sont remplis avec

2,5 ml de ce mélange bien homogénéisé. Avant la solidification du gel quelques gouttes d'eau sont déposées sur la solution du gel. Une interphase formée après 10 - 20 min. indique la solidification du gel. Après 1 heure, l'eau au dessus du gel est enlevée et les deux bacs de l'appareil d'électrophorèse sont remplis avec du tampon. On fait passer le courant, et les échantillons, rendus plus denses avec un peu de saccharose, sont déposés très doucement à la surface du gel. Le temps d'électrophorèse est de 2 h. à 90 - 120 mA et de 50 volts.

A la fin de l'électrophorèse, les gels sont retirés des tubes de verre, en passant l'eau autour du gel à l'aide d'une seringue. Le gel est coloré pendant 1 heure avec une solution de bleu de Coomasie de 1,25 g dans 454 ml de méthanol à 50 pour cent et 46 ml d'acide acétique.

La décoloration du gel est faite par le mélange d'une solution de 50 ml méthanol + 75 ml acide acétique + 875 ml d'eau en changeant plusieurs fois la solution de décoloration, jusqu'à ce que le gel soit incolore. Alors, on lit la position des bandes de l'échantillon analysé par rapport au gel témoin qui donne la position du virus purifié.

3. Milieu de culture.

Milieu de Roux pour cultures de Tomates.

Quantités pour 1 litre.

Macroéléments

$K NO_3$	0,434 g
$(Na_3)_2 Ca$	0,607
$(NO_3)_2 Mg\ 6 H_2O$	0,038
$PO_4 H_2 K$	0,136
$SO_4 Mg\ 7 H_2O$	0,184
Na Cl	0,17

Dilué 2 x et pH ajusté à 6,2

Oligoélements

Molybdate d'ammonium	0,05 mg
Acide borique	1,5
SO_4 Mn 4 H_2O	2,0
SO_4 Zn 7 H_2O	0,5
SO_4 Cu 5 H_2O	0,25

Fer sous forme complexée	5 ml d'une solution à
SO_4 Fe 7 H_2O	5,54 g
EDTA Na_2	7,45 g

Agar 0,8 %

Le développement des plantules s'est avéré excellent sur ce milieu.

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

PREMIERE PARTIE.

Détection des virus dans différentes parties des plantes porte-graines par la voie biologique.

A - RECHERCHE DU VIRUS AU NIVEAU DES BOUTONS FLORAUX

Les boutons floraux de Tabac sains et infectés sont prélevés à six stades différents de taille 2mm. à 13 mm. , ainsi que les fleurs, avec le plus grand soin, pour éviter toute contamination. Quand les boutons sont tout petits, ils sont broyés entiers tandis que pour les autres stades de boutons floraux, sépales, pétales, étamines et pistils sont disséqués.

Les différentes pièces sont broyées séparément dans le tampon phosphate 0,01M pH 7,2 additionné de 0,4 pour cent de mercapto-éthanol. Les quantités de tampon utilisées pour chaque partie de bouton varient de 0,1 ml à 1 ml selon la grosseur de la pièce et les difficultés du broyage.

175 boutons floraux ont été disséqués et 125 d'entre eux ont été soumis au test du pouvoir infectieux, les 50 autres ayant été gardés pour le test au latex. Dans un premier essai avec trente boutons floraux, chaque bouton est disséqué et broyé individuellement tandis que dans le deuxième essai 145 bourgeons sont broyés par groupes de cinq, avec 0,5 ml du tampon phosphate.

Les résultats des essais du test de pouvoir infectieux montrent que les différentes parties testées contiennent le virus. Tableau 7.

On constate également que les étamines et pistils de tous les stades se sont montrésmoins infectieux que les sépales correspondants.

Mise en évidence du virus de la Mosaïque du Tabac dans différentes parties des boutons floraux.

Tableau 2 :

Stade	Nombre de boutons testés	Pièces testées	Nombre moyen de lésions locales par demi-feuille	
			Essai I	Essai II
1	4* + 6**	Boutons entiers	0	10
2	10 + 20	Etamine et pistil	0	16
		sépale	0,9	35,5
3	6 + 20	Etamine et pistil	3	3
		Sépale et pétale	2	27
4	8 + 10	Etamine et pistil	2 0,2	9
		Sépale et pétale	8,6	36
5	3 + 15	Etamine	3	10
		Pistil	0,3	
		Sépale et pétale	12	72
6	0 + 5	Etamine et pistil	-	21
		Sépale et pétale	-	104

* Essai I ; ** Essai II.

Les chiffres sont les moyennes arithmétiques des lésions locales apparues sur les demi-feuilles de Nicotiana tabacum Xanthi. Les deux essais comportent respectivement deux et six répétitions. Les résultats d'essais avec cinq boutons floraux de chaque stade prélevés sur Tabac sain et inoculés dans les mêmes conditions sont demeurés négatifs.

Les résultats sur pièces florales confirment ceux obtenus avec les boutons floraux : on détecte régulièrement le virus dans les différentes pièces florales.

Tableau 3 :

Test du pouvoir infectieux dans les différentes pièces florales.

Nombre de fleurs disséquées	Nombre moyen de lésions locales par demi-feuille						
	Pétale	Sépale	Anthère	Filet	Ovaire	Style	Stigmate
Saines(4)	0	0	0	0	0	0	0
Infectées(8)	60	72	37	9	10	3	7

Les conditions d'essai sont identiques à celles de l'essai précédent (Tableau 2), chaque nombre est la moyenne de quatre à six répétitions, suivant la quantité de tampon utilisé.

Les fleurs subissent un traitement de décontamination de surface par 10% $Na_3 PO_4$ et, après lavage abondant à l'eau, sont disséquées en sépales, pétales, filets, anthères, ovaires, styles et stigmates. Les différentes pièces sont broyées dans 0,5 à 1 ml de tampon phosphate. Il est indispensable de diluer dix fois le broyat de sépales et pétales pour dénombrer les lésions locales aisément. (Tableau 3).

B - RECHERCHE DU VIRUS AU NIVEAU DU POLLEN

1. Etude du pouvoir infectieux du pollen.

Les grains de pollen à partir d'anthères déhiscentes de Tabac "Samsun" sain et infecté sont récoltés dans un tube de diamètre 75 mm. Des précautions extrêmes ont été prises pour que les pétales ne touchent pas le bord du tube. Les grains de pollen sont mis en suspension dans du tampon phosphate et répartis dans différents tubes pour subir les différents traitements suivants :

1 - des lavages successifs (deux à trois fois) avec 1 ml de tampon. Le pollen lavé est remis en suspension dans 0,5 ml de tampon.

2 - une décontamination de la surface du pollen pendant dix minutes avec du phosphate trisodique à 10 pour cent. Le pollen est ensuite lavé deux à quatre fois avec une grande quantité de tampon phosphate pour enlever le

phosphate trisodique et remis en suspension dans 0,5 ml de tampon.

3 - Le pollen lavé est mis en suspension dans du saccharose à 10% et après une incubation de deux heures, lavé avec du tampon pour enlever le saccharose et remis en suspension dans 0,5 ml de tampon.

Le pollen issu des différents traitements est broyé avec le "potter"; le pollen broyé, ainsi que le tampon des lavages,est inoculé sur huit demi-feuilles de Nicotiana tabacum Xanthi.

Les résultats qui sont rassemblés dans le Tableau 4 sont issus de trois essais effectués et chaque essai comporte des grains de pollen obtenus de quatre à cinq fleurs.

Tableau 4 :

Etude au niveau du pollen

Traitement	Nombre moyen de lésions locales		
	Essai I	Essai II	Essai III
1.Pollen non lavé	0	0	-
2. Pollen lavé	0	0	2
3. Tampon de lavage	0,4	0	0,3
4. Pollen décontaminé avec phosphate trisodique à 10 %	0	0	0
5. Pollen lavé et mis en suspension dans du saccharose 10%	-	0,1	0

2. Etude par la fécondation artificielle.

Pour étudier la transmissibilité du virus par le pollen, ce dernier est récolté à partir de Tabac "Samsun" sain et infecté et soumis à deux séries d'expériences de fécondation croisée sur le Tabac "Samsun" sain dont on a enlevé les anthères en prenant toutes les précautions nécessaires (cf. méthodes page 70). Dans une première expérience aucune décontamination du pollen n'a été effectuée, tandis que dans le deuxième essai elle a été réalisée avec 0,2 % phosphate trisodique (concentration de phosphate trisodique qui ne lyse pas le pollen et permet sa germination). Après

décontamination le pollen est lavé à l'eau distillée et ensuite déposé sur le stigmate du Tabac sain. Le pollen prélevé sur un Tabac sain sert de témoin. A la suite de la fécondation, dix sept et quarante huit capsules ont été obtenues respectivement dans les deux essais, ce qui donne un pourcentage de réussite de 48 pour cent de fécondation artificielle. Les capsules sont récoltées après un mois et les graines de chaque capsule recueillies séparément et broyées dans le tampon phosphate et l'extrait inoculé sur deux feuilles entières du Tabac "Xanthi".

Les broyats des graines de deux des seize capsules issues du pollen infecté, ont réagi positivement avec une moyenne de trois lésions et 0,5 lésions respectivement. Les broyats des graines de trois capsules témoins issues de pollen sain, broyées dans les mêmes conditions, n'ont donné aucune lésion locale.

Ces mêmes graines, conservées environ dix huit mois en sachet de papier à la température du laboratoire, broyées avec 0,5 à 0,8 ml de tampon et inoculées sur six demi-feuilles du Tabac "Xanthi" n'ont donné aucune lésion locale.

Les graines issues du deuxième essai n'ontpas été testées par le pouvoir infectieux. Les graines de ces deux séries d'expériences ont été groupées et incluses dans la paraffine pour le test d'immunofluorescence sur coupes.

C - RECHERCHE AU NIVEAU DES GRAINES

Nos essais sur les graines ont été effectués avec neuf lots différents de graines dont six provenant de Tabac "Samsun" et trois de Tabac "Xanthi" qui est un hôte hypersensible du virus de la Mosaïque du Tabac à 20 ° C qui réagit par des lésions locales nécrotiques et se comporte ainsi comme un hôte systémique à température supérieure à 30°C. (MARTIN et GALLET, 1966.).

1. Pouvoir infectieux des graines.

150 mg de graines de chaque lot sont immédiatement après leur récolte, broyés dans 5 ml du tampon phosphate et le broyat est inoculé sur huit à dix demi-feuilles du Tabac "Xanthi". Les répétitions sont distribuées dans trois à quatre plantes. Les lésions locales sont dénombrées après quatre à cinq jours (Tableau 5).

Tableau 5 :

Analyse de la nature infectieuse des lots de graines

N° du lot	Désignation du lot	Nombre moyen de lésions locales
1	Samsun infecté	87
2	" "	207
3	" "	182
4	" "	63
5	" "	-
9	Samsun sain	0
6	Xanthi sain (30°)	0
7	Xanthi infecté (30°)	369
8	Xanthi sain (20°)	0

2. Localisation de l'infection dans la graine.

Pour préciser si l'infection est externe ou interne, nous avons entrepris soit :

1°/ un lavage des graines par agitation dans du tampon phosphate et ce tampon de lavage a été lui-même testé.

2°/ une décontamination par le phosphate trisodique à 10%, suivie d'un lavage abondant dans l'eau distillée.

Neuf lots de graines ont été ainsi examinés. La quantité des graines broyées est de 100 mg et le volume du tampon de lavage et du tampon de broyage est de 5 ml dans tous les essais. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

On constate que le lavage avec le tampon ou la décontamination par Na_3PO_4 10% ne diminue pas le taux d'infection dans la graine. L'infection de celle-ci est donc interne.

Tableau 6 :

Localisation de l'infection dans la graine

Essai	Lot des graines ds l'essai	Nombre moyen des lésions locales			
		Tampon après lavage des graines	Graines décontaminées avec Na_3PO_4	Graines lavées et broyées	Graines non lavées et non décontaminées
I	1	0,3	8	2	-
	2	3	95	80	-
	3	4,4	15	17	-
	4	6	13	26	-
II	3	-	0	0	0
	4	-	122	237	218
III	1	0,5	6	4	6
	2	0,1	37	52	24
	4	2	62	35	33
	5	2,5	0	43	24
	9	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	67	313	275	369
	8	0	0	0	0
IV	2	0,1	18	2	5
	4	0,2	8	0,2	6
	5	0,8	5,5	6	4
	9	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	5	40	10	76
	8	0	0	0	0

3. Evolution du pouvoir infectieux au cours de la conservation des graines.

Les graines sont conservées en petits sachets de papier à la température du laboratoire. Lors de l'étude de la localisation de l'infection des graines dans différents essais exécutés à différentes périodes, nous avons constaté une perte considérable du pouvoir infectieux. Ce phénomène est très net pour le lot n° 3 de graines Samsun qui, après une période de conservation de neuf mois, a perdu tout pouvoir infectieux. (Tableau 7).

Tableau 7 :

Cinétique du pouvoir infectieux des graines.

Numéro du lot des graines	Périodes après la récolte des graines				
	1er mois	2è mois	9è mois	18 è mois	19è mois
1	82	-	-	6	-
2	207	-	-	24	5
3	182	-	0	-	-
4	63	-	218	33	6
5	-	-	-	24	4
9	0	0	-	-	-
6	0	0	-	-	-
7	369	76	-	-	-
8	0	0	-	-	-

Les chiffres, dans le tableau, indiquent le nombre moyen de lésions locales obtenues à la suite de l'inoculation sur huit, dix demi-feuilles de Tabac Xanthi des broyats de graines non lavées et non décontaminées.

D - RECHERCHE AU NIVEAU DES PLANTULES

Des plantules de Tabac issues de la germination de graines saines et infectées (lot 2), n'ont manifesté aucun symptôme, même après repiquage dans des terrines, leur croissance ayant été suivie jusqu'au stade six, huit feuilles.

Des plantules du même lot, âgées de quarante jours, inoculées mécaniquement avec du virus purifié, ont manifesté les symptômes après une semaine.

A la suite de ces expériences, nous avons entrepris de contrôler, dans les plantules sans symptômes, la présence éventuelle de l'infection sous une forme latente.

Dix sept grammes de plantules de Tabac Samsun sain puis infecté, sont broyés dans 5 ml de tampon phosphate en présence de 0,08 pour cent de mercaptoéthanol. Les extraits sons inoculés sur neuf demi-feuilles du Tabac "Xanthi". Aucune lésion locale n'a été obtenue après quatre à cinq jours. (Tableau 8).

Le pouvoir inhibiteur éventuel des extraits de plantules, pouvant gêner la détection d'une infection latente, a été contrôlé par mélange du virus à 48, 36, 24 et 12 µg avec le jus des plantules saines et "infectées" et inoculation des feuilles de Xanthi dans les mêmes conditions que pour l'essai précédent. Les résultats dans le tableau 8, montrent que des extraits des plantules pourraient gêner la détection du virus.

Tableau 8 :

Traitement	Nombre moyen des lésions locales				
	Conc. virus purifié en µg				Nombre des feuilles avec t T_1 et T_2
	48	36	24	0	
Extrait des plantules saines (T_1)	201	157	172	0	9^{xx}
Extrait des plantules infectées (T_2)	195	160	132	0	9^{xx}
Témoin virus (t)	429	361	417	-	9^{xx}

xx significatif au seuil 1 %.

Les jeunes plantules, dans un stade d'active croissance, ne permettent peut-être pas la multiplication virale, nous avons procédé à l'inoculation mécanique des plantules à un stade précoce avec le VMT purifié à différentes dilutions. Cet essai a été effectué avec les plantules issues des lots de graines Samsun 2, 3, 4, 5 et 9.

Après décontamination dans le tampon phosphate à 10% ou sans décontamination les lots de graines ont été semés dans un mélange de terreau stérilisé. Les plantules ayant deux feuilles ont été repiquées après vingt jours en terrines stérilisées et, cinq jours après le repiquage, les plantules ont été inoculées avec différentes dilutions du virus.

L'inoculation est faite par une légère abrasion à l'aide d'une pince au bout de laquelle est fixée une éponge trempée dans la dilution du virus à inoculer. Les plantules frottées avec le tampon ont servi de témoin. Les premiers symptômes sont apparus au bout d'une semaine et les plantules inoculées avec la dilution minimum du virus ont manifesté les symptômes au bout de la deuxième semaine. Les plantules ont été suivies pendant deux semaines en plus. Après cette période la notation des plantules ne présentant pas les symptômes a été faite. (Tableau 9).

Tableau 9 :

L'infection précoce des plantules.

Lot des graines	Dilution du virus purifié en mg											
	6	5	4	3	2	1	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
9	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	14	12
9_D*	-	-	-	-	-	-	-	-	14	14	10	13
3	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	10	5	7	-	-	-	9	-	-	-	-
4_D	10	8	14	9	-	-	-	-	-	-	-	-
5	12	-	-	-	12	13	9	-	-	-	-	-
5_D	-	-	-	-	*	17	16	18	-	-	-	-

* $_D$ - Lot de graines décontaminées.

Les chiffres indiquent le nombre de plantules, inoculées pour chaque dilution de virus, ne présentant pas les symptômes apparents. 19 à 30% des plantules inoculées par différentes dilutions n'ont pas manifesté les symptômes, mais ont été pour la plupart, trouvées infectieuses à la suite d'une concentration des jus cinq fois par PEG et inoculation sur les feuilles de Nicotiana tabacum Xanthi.

Une autre voie que nous avons poursuivie pour déterminer si l'infection passe dans les plantules a consisté à utiliser le phénomène

d'hypersensibilité que VMT produit dans Nicotiana tabacum Xanthi.

A cet effet nous avons fait pousser, à 30°C, du Tabac Xanthi; à cette température, le virus se généralise dans les plantes et les graines qui en sont issues se sont révélées très infectieuses. (cf. page 45 , lot de graines N°7). Un lot N°6 de Xanthi sain cultivé dans ces mêmes conditions nous a servi de témoin.

Pour éviter toute contamination artificielle ces graines sont semées en nombre limité pour éviter le repiquage dans des terrines stérilisées. Une autre partie de ces graines est semée dans de petits tubes contenant du milieu de Roux gélosé, stérilisé; 70 graines infectées et 48 graines saines ont été semées à raison d'une graine par tube. Les graines, auparavant, ont été stérilisées par l'hypochlorite de calcium (35% Cl) à 5% pendant 45 mn. Les tubes et les terrines ont été laissées en chambre climatisée à 30°C pendant dix à quinze jours et ensuite transférés à 20°C. Les tubes permettent de suivre la germination et l'apparition des symptômes. Les lectures sont faites à la fin du séjour à 30°C et à la fin de l'expérience qui dure trois semaines en tout. Les résultats présentés dans le Tableau 10 traduisent les observations faites sur ces plantules en tubes.

Tableau 10 :

Effet du transfert de température sur la germination des plantules

N° du lot	Désignation du lot	à 30°			à 20°		
		Graines germées	Graines non germées	Feuilles anormales ou gr. peu germées	Graines germées	Graines non germées	Feuilles anormales ou graines peu germées
7	Xanthi (30°) infecté	42	23	5	43	21	6
6	Xanthi (30°) sain	36	9	3	39	8	1
9	Samsun (20°)sain, 41 graines plantées	5	30	3	35	1	7

Comme le montre le tableau 10, on n'a observé aucune plantule nécrosée à la suite du transfert de température. Une observation semblable a été notée avec les graines semées dans la terrine. De même, 68 graines

virosées Samsun semées et maintenues pendant un mois en tubes avec le milieu de culture à 20°C, n'ont présenté aucun symptôme. 54 graines saines ont servi de témoin. Toutes les plantules de'Samsun'et'Xanthi" ont été soumises ensuite au test sérologique.

Nous concluons donc après cette étude de détection du virus de la Mosaïque du Tabac, par voie biologique, que le virus infecte le bouton floral, à partir du stade même du bouton présentant le première ébauche des sépales et les différentes pièces florales, le pétale, le sépale, l'ovaire, le style, le stigmate, le filet, l'anthère, à l'exception du pollen. Les graines issues des plantes atteintes systémiquement par le virus sont infectieuses et l'infection semble localisée à l'intérieur des graines, comme le montrent, d'une part, l'expérience de lavage, et d'autre part, l'absence des symptômes sur les plantules qui sont issues de ces graines, même après repiquage. La possibilité de l'infection latente a été exclue à la suite des expériences sur le pouvoir infectieux des extraits des plantules et le transfert de températures des plantules d'hôte hypersensible.

DEUXIEME PARTIE.

ETUDES SEROLOGIQUES

Cette partie de l'exposé de nos travaux apporte des données complémentaires à celles présentées au chapitre précédent, la recherche du VMT aux différents stades précisés lors de la définition de notre hypothèse de travail étant effectuée ici par la voie sérologique.

L'objectif consiste :

à déceler la quantité minimale d'antigène viral (donc à élaborer une technique possédant une haute sensibilité)

à observer la localisation de cet antigène (ce qui nous amène à résoudre, en particulier, le problème de la pénétration des anticorps in situ, soit par la technique des coupes soit par l'obtention de protoplastes).

Nous avons donc adapté à notre problème deux techniques immunologiques :

1 - Test au Latex

2 - Immunofluorescence.

Les deux techniques sont décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes (pages 27 et 34).

Avant d'exposer les résultats acquis par l'utilisation de ces techniques sur notre matériel d'étude, nous décrivons d'abord la purification des immunoglobulines spécifiques du virus de la Mosaïque du Tabac (désormais appelées IgG -MT) qui est un préalable important pour les deux tests que nous utilisons.

A - PURIFICATION DES IgG -MT

Le test au latex nécessite une certaine purification des IgG. - (Bercks, 1967). Pour la purification des IgG-MT nous avons élaboré et comparé deux méthodes :

1° - Dissociation du complexe antigène-anticorps dans un pH acide.

2° - Relargage fractionné des Immunoglobulines par le sulfate d'ammonium.

Méthode 1

1. Dissociation du complexe antigène-anticorps.

L'opération se passe en deux temps. Dans le premier temps, on précipité sélectivement les anticorps antivirus en ajoutant au sérum une quantité dosée de VMT purifié. Dans le deuxième temps, on dissocie ce complexe dans un tampon à pH acide et on sépare la fraction anticorps du VMT par ultracentrifugation.

a) Estimation du rapport de concentration antigène-anticorps.

Pour réaliser une précipitaion quantitative des anticorps, nous avons tout d'abord déterminé la zone d'équivalence; on sait en effet (STAUB, A.M. Cours d'immunologie de l'Institut Pasteur. 1972 Fascicule II) que dans cette zone d' équivalence un maximum d'antigène et d'anticorps sont précipités.

Nous avons estimé cette zone pour notre sérum par le titrage d'un volume de sérum constant contre un volume croissant d'antigène et l'importance du précipité est appréciée de façon très grossière à l'oeil après centrifugation à basse vitesse.

1 ml de sérum est ainsi dilué cinq fois avec du sérum physiologique et mis en présence de volumes croissants de virus à 22,1 mg/ml.

Quantité du virus(ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4
Quantité du sérum(ml)	5	5	5	5	5	5	5
Importance du précipité	+	++	++	+++	+++	+++	+++

A la suite de cet essai préliminaire, nous avons donc opté pour un rapport de 22 mg de virus pour 1 ml de sérum.

b) Dissociation du complexe antigène-anticorps.

La dissociation du complexe antigène-anticorps est effectuée dans le tampon Hcl-glycine 0,1 M à pH 2,8. Après la dissociation, l'anticorps est séparé de son antigène. Il est nécessaire que cette dissociation soit opérée rapidement et à basse température en raison de l'effet dénaturant du pH acide sur les anticorps. L'insolubilisation de l'antigène sous forme

d'immunoabsorbant à l'aide de glutaraldéhyde selon la méthode décrite par AVRAMEAS et TERNYNCK (1969) permet, après dissociation, de séparer instantanément l'anticorps qui est soluble dans le milieu de dissociation. Cette méthode d'insolobilisation de l'antigène a été développée en parallèle pour le virus de la Mosaïque du Tabac et le virus de la Mosaïque Jaune du Navet. Dans ce dernier cas, le résultat est très bon et nous avons pu par cette méthode, isoler les immunoglobulines spécifiques du virus (BENOIT et MAURY, à publier).

Mais dans le cas du virus de la Mosaïque du Tabac, mêmes à des concentrations très élevées de virus (50 mg/ml) ou en présence d'albumine bovine à concentration élevée, la glutaraldéhyde ne permet pas l'insolubilisation du VMT.

Pour séparer le VMT de son anticorps , après dissociation, on peut penser à une chromatographie d'exclusion sur Sephadex ou à une chromatographie sur hydroxyapatite. Cependant il est important que l'opération soit très rapide. Nous avons finalement opté pour une ultracentrifugation de 30 mn à 200.000 g qui sédimente le virus et les éventuels complexes VMT-anticorps non dissociés. On ramène alors rapidement le pH à la neutralité pour stabiliser les anticorps. Cette technique est délicate et nécessite que toutes les opérations s'effectuent à 4°C.

c) Technique de la purification des IgG-MT

Les différentes opérations sont schématisées ainsi :

La précipitation d'antigène-anticorps est effectuée avec le sérum dilué dix ou cinquante fois et le virus à la concentration correspondante.

à + 4°C :

Agitation 10 mn.

Centrifugation 15 mn à 5000 g

Culot lavé deux fois dans sérum physiologique en homogénéisant bien au "potter".

Culot du deuxième lavage dissocié dans tampon HCl - glycine 0,1 M pH 2,8 (Formule des réactifs, page 55) bien homogénéisée au "potter".

Centrifugation de la suspension dans un rotor Spinco SW_{50} pour 30 mn. à 200.000 g.

Le surnageant est neutralisé tout de suite

par $K_2H\,PO_4$ 1M Culot écarté

(15 ml K_2HPO_4 1M pour 30 ml du surnageant pour avoir le pH 7).

L'anticorps dialysé 24 heures contre sérum physiologique avec deux changements du bain de dialyse et concentré par 10% carbowax 4000 dans sérum physiologique jusqu'au volume final atteint : 5 à 6 ml. Cette fraction IgG est appelée IgG_1 pour la distinguer d'autres IgG purifiées par l'autre méthode.

Formule des réactifs :

Tampon HCl-glycine 0,2 M pH 2,8:

Acide chlorhydrique 2 N	50 ml.
Glycine 2 M	75 ml.
Eau distillée q.s.	500 ml.

Solution de carbowax à 10% dans sérum physiologique :

Carbowax 4000	100 g
Sérum physiologique pH 7,2 q.s.	1l.

Quatre purifications ont été réalisées par cette technique donnant un titre d'anticorps établi par la précipitation en anneau variant entre quatre et seize. Ce rendement faible nous a amené à choisir une technique donnant un meilleur rendement en immunoglobulines non dénaturées et dont le degré de spécificité est malgré tout garanti par les tests négatifs de détection préalable d'immunoglobulines anti-protéines du Tabac.

Méthode 2

2. Relargage fractionné par le sulfate d'ammonium.

Nous avons procédé à un relargage graduel par le sulfate d'ammonium. Les différentes opérations sont les suivantes:

1. 5 ml de sérum de titre 2000
   + 5 ml de sérum physiologique
   + 5 ml de sulfate d'ammonium à 70 %

2. Agiter 15 mn et laisser à + 4°C, 15 mn.
Centrifuger 30 mn à 3000 g

3. Reprendre le culot I dans 2,5 ml de sérum physiologique
+ 2,5 ml de sérum physiologique } Surnageant I
+ 2,5 ml de sulfate d'ammonium à 70%

4. Agiter 15 mn et laisser à 4°C 15 mn.
Centrifuger 30 mn à 3000 g.

5. Reprendre le culot dans 5 ml de sérum physiologique
(Fraction I) IgG_I

6. Précipiter 15 ml du surnageant I avec 7 ml de sulfate d'ammonium.
Mêmes opérations d'agitation et centrifugation.

7. Reprendre le culot II dans 2,5 ml de sérum physiologique
+ 2,5 ml de sérum physiologique } Surnageant II
+ 2,5 ml de sulfate d'ammonium
Agiter et centrifuger 30 mn à 3000 g.

8. Reprendre culot dans 5 ml de sérum physiologique
(Fraction II) IgG_{II}

9. Précipiter 22 ml du surnageant avec 10 ml de sulfate d'ammonium
Mêmes opérations d'agitation et centrifugation.

10. Reprendre le culot III dans 5 ml de sérum physiologique
(Fraction III) IgG_{III}

Les trois fractions sont dialysées séparément contre le sérum physiologique en changeant le bain de dialyse deux, trois fois. Le bain de dialyse est à la fin testé pour la présence d'ion ammonium par le réactif Nessler.

Le titre de ces trois fractions estimé par la précipitation en anneau est respectivement I/16, I/32 et I/16.

Les IgG purifiées par ces deux méthodes sont conservées à - 20°C dans un volume égal de glycérine bidistillée.

Cette purification des IgG - MT par relargage graduel au sulfate d'ammonium a été comparée à la méthode de relargage au sulfate d'ammonium à 50% de saturation, appelons IgG - IV. Deux précipitations avec le sulfate d'ammonium à 50% de saturation ont été faites. Le culot de la deu-

xième précipitation repris dans du sérum physiologique tamponné est dialysé, contre du sérum physiologique tamponné, pendant deux jours, jusqu'à élimination totale de l'ion ammonium. Le titre d'anticorps estimé par la précipitation en anneau est 1000, ce qui correspond à un rendement supérieur à 50%.

B - CARACTERISATION DES IgG-MT PAR IMMUNOELECTRO PHORESE.

Les fractions IgG MT sont comparées aux protéines sériques du lapin développées par un sérum chèvre ou mouton antilapin. (AUGIER de MONTGREMIER, 1970) Photo 3.

Photo 3. Sérum lapin anti Mosaïque du Tabac développé par sérum chèvre anti-lapin.

Les fractions IgG purifiées par les différentes méthodes sont analysées électrophorétiquement par le procédé décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes.

La disposition des IgG et des réactifs est indiquée dans la figure 4 (Photos 4 et 5).

Fig. 4 . Disposition des IgG VMT et des réactifs
SCAL - Sérum chèvre anti-lapin
smt - sérum lapin anti-Mosaïque du Tabac.

La figure 4_a montre que les IgG_1 purifiées par dissociation, du complexe antigène-anticorps sont d'une très grande pureté électrophorétique et immunologique et sont actives même si le rendement est faible.

Les IgG fractions I et III aussi pures électrophorétiquement que

IgG_1 forment des arcs de précipités du côté de la cathode (Fig.4b, c, d)Ces fractions se sont montrées actives dans le test en anneau. Par ailleurs, le latex sensibilisé par ces fractions et titré contre différentes dilutions de virus purifié confirme les observations du test en anneau. Par contre, IgG IV est partiellement pure(Fig.4e) et active (Fig.4f).

Photo 4:Immunoélectrophorèse de la fraction IgG_I par appareil type "Polyphor".

Photo 5: Immunoélectrophorèse des fractions IgG_I, IgG_{II}, IgG_{III} et IgG_{IV} par l'appareil type LKB.

TEST AU LATEX :

C - COMPARAISON DE L'ACTIVITE ANTICORPS DES DIFFERENTS IgG SENSIBLES ET DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DU TEST AU LATEX.

Le virus purifié est dilué en série et 0,5 ml de chaque dilution est déposé dans une alvéole de Kline.

On ajoute alors 0,2 ml de latex sensibilisé par les différentes fractions IgG purifiées. L'agglutination est observée après une agitation de 15 mn. (Photo 6-3).

La quantité de VMT minimum mise en évidence par les cinq préparations de latex sensibilisé est

latex - IgG_1	0,6 µg/ml	VMT purifié
latex - IgG_1	0,4 µg/ml	" "
latex - IgG_{II}	0,6 µg/ml	" "
latex - IgG_{III}	0,4 µg/ml	" "
latex - IgG_{IV}	0,2 µg/ml	" "

On vérifie que les témoins restent négatifs et qu'un jus de feuille virosée donne, soit directement, soit après dilution dans un tampon, une réaction positive. Les différents aspects d'une réaction positive en fonction du temps et en fonction de la dilution de l'antigène sont présentés dans les photos 6-2 et 6-3. On peut noter l'importance de la dilution de l'antigène sur la formation des complexes particules de latex - IgGMT : VMT : IgGMT - particule de latex conséquence du phénomène de zone d'équivalence, caractéristique de la réaction antigène-anticorps. Ceci est bien mis en évidence sur la photo 6-4.

Photo 6 **Test au latex.**

6 - 1 **Effet de la dilution de l'extrait de feuilles virosées sur l'agglutination du latex sensibilisé avec des IgGMT.**

rangs 1 et 2 Série de dilutions de l'extrait de feuilles

rang 3, alvéoles 1 à 3 Témoins avec latex non sensibilisé.

6 -2 et 6 - 3 Aspects successifs de l'agglutination du latex sensibilisé dans les alvéoles à des temps différents allant de 10 mn (alvéoles du haut) à 20 mn (alvéoles du bas) après l'arrêt de l'agitation.

La photo 6 - 2 correspond à trois dilutions de l'extrait de feuilles virosées.

La photo 6 - 3 correspond à trois dilutions de VMT purifié.

DETECTION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC DANS DIFFERENTES PARTIES DES PLANTES PORTE-GRAINE PAR LA VOIE SEROLOGIQUE.

A - TEST AU LATEX SUR :

1. des boutons floraux.

Une partie des échantillons de boutons floraux semblable à celle utilisée dans le test du pouvoir infectieux (page 40) est soumise au test au latex.

Les différentes parties disséquées du bouton floral dans chacun des six stades sont broyées en groupe de cinq avec 0,5 ml ou 1 ml de tampon phosphate 0,01 M et le jus est clarifié par une centrifugation de 10 mn à 3000 g. Le jus clarifié est dilué deux, quatre et huit fois et chaque dilution est déposée dans une alvéole d'une plaque de Kline. Le latex sansibilisé avec les anticorps IgG I et III est mélangé dans les proportions que l'on a déjà définies. Après une agitation de 15 mn, la lecture est faite (tableau 11).

Tableau 11 :

Réaction du test au latex sur bouton floral

Bouton floral de différents stades en groupes de 5	Etamine + pistil		Sépale	
	Nbre du groupe testé	Nbre du groupe positif	Nbre du gr. testé	Nbre du gr. positif
Stade I	2 *	1	-	-
Stade II	3	0	3	1+(1)
Stade III	1	0	4	4
Stade IV	3	3	1	1
Stade V	1	0	4	4
Stade VI	1	(1)	2	2

* bouton broyé entier

(1) agglutination douteuse

Parmi les deux groupes de cinq boutons tout petits de stade I, un groupe a réagi "positif" dans le test au latex. Les sépales de tous les stades ont montré une agglutination avec tous les groupes essayés tandis que les étémines et les pistils de trois stades ont réagi "négatifs".

2. des fleurs.

Les extraits dilués des différentes parties des fleurs ont été testés par le latex sensibilisé avec les fractions d'anticorps utilisées par le test avec le bouton floral. Alors que les jus des pétales, des sépales, des ovaires, des anthères, des stigmates ont donné une agglutination, celui des filets, des styles n'ont pas donné de réaction positive.

Les témoins de ces essais ont tous été négatifs.

3. des plantules.

Les plantules issues de tous les lots de graines, après avoir été suivies pour l'apparition de symptômes, sont soumis au test au latex.

Les résultats des essais présentés dans le tableau 12, ont été faits à différentes périodes et avec du latex sensibilisé avec différentes fractions d'IgG. Les résultats d'essais montrent que malgré les réactions positives aveo la plupart des extraits des plantules provenant des graines infectées, les extraits des plantules des graines "samsun" et xanthi" non infectées et certains des témoins entrafnont aussi une agglutinatination non-spécifique.

La non spécificité des réactions peut se produire soit :

1 - par la présence d'anticorps qui ne sont pas spécifiques de l'antigène viral;

2 - par le pouvoir d'agglutination dû à l'extrait lui-même vis-à-vis du latex non sensibilisé ou sensibilisé.

Le contrôle de la spécificité des anticorps étant faite, il reste à préciser ici l'influence de la méthode d'extraction des jus de plantules sur l'agglutination du latex non sensibilisé.

Nous avons essayé plusieurs méthodes d'extraction avec différents lots de plantules dans les terrines et milieux de culture.

Les jeunes plantules entières, les feuilles et les racines des plantules congelées sont broyées dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,2 avec 0,4 % mercapto-éthanol.

Le broyage est fait au "potter" ou au mortier avec 0,2 - 0,5 ml tampon par plantule ou un volume en ml égal au nombre de grammes de plantules quand elles sont groupées. Le jus extrait est clarifié soit par :

1 - une centrifugation 3000 g pendant 10 mn

2 - une homogénéisation de l'extrait avec n.- butanol à 8 % suivie par une concentration PEG 4% avec NaCl.

Tableau 12

Réaction du test au latex sur des plantules des différents lots de graines.

Numéro du lot	Nombre des plantules soumises au test	Essai		Essai II	Essai III
		Nombre de plantules		(+) ou (-)	(+) ou (-)
		(+) ou (-)	+		
I	A partir de graines Samsun saines				
9	1 . 45	-	-		
	2 . 48 feuilles	23*	3		
	46 racines	1	-		
	3 . 4 I de milieu de culture	4	-		
	4 . 52 de milieu de culture	-	-	++	-
9 D	72	-	-		++
II	A partir de graines Samsun infectées				
	63 de milieu de culture	7	-	-	-
2 Tp	43 feuilles	3	1		
	48 racines	2	-		
2					++
3 Tp	48	10	2		
3 D	1) 96	37	3		
	2) 24	-	-		++
4 Tp	29 feuilles	11	2		
	29 racines	-	-		
4 D	43	-	-		++
4	1) 22	-	-		
	2) 40 g de feuilles soumises à concentration PEG.	+	-		
5 D	48 feuilles	2I	1*		
Tp	48 racines	-	2		
5 D	48	-	-		
5	1. 300 mg de feuilles soumises à extraction avec 2 ml du tampon :	-	-		++
	2. 73 g de feuilles soumises à concentration PEG.	+	-		
III	Xanthi graine saine (30°)				
6	1. 45 de milieu de culture	15*	-		
	2. 56 de terrine	-	-		
IV	Xanthi graine infectée (30°)				
7	1. 67 de milieu de culture	19*	-	++	+
	2. 74 de terrine	-	-		
V	Xanthi graine saine (20°)				
8	300 mg de feuilles soumises à extraction avec 2 ml de tampon	-	-	++	++
VI	Feuille de plante				
	1. Samsun sain	-	-	-	-
	2. Samsun infecté	+	-	++	+
	3. Xanthi sain (20°)	-	-		

* - indique une agglutination de 1 ou 2 échantillons avec latex non sensibilisé

D - graine décontaminée avec Ca O Cl_2 6‰ pendant 45 mn.

Tp - Plantule inoculée avec du tampon.

3 - une homogénéisation de l'extrait avec le chloroforme suivie par une centrifugation à 3000 g pendant 10 mn. Les traces de chloroforme sont enlevées de la phase aqueuse par évaporation avec un agitateur magnétique.

Le jus clarifié est utilisé tel quel avec des plantules broyées individuellement mais est utilisé en dilution de deux, quatre, huit et seize quand elles sont groupées.

Pour bien vérifier la nature d'agglutination d'extraits des plantules dans le test au latex, les extraits sont vérifiés immunoélectrophorétiquement et par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

B - ANALYSE DES EXTRAITS DES PLANTULES PAR IMMUNO-ELECTROPHORESE ET ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Les extraits des plantules des lots de graines correspondant aux essais II et III du test au latex sont soumis à une électrophorèse (cf. Matériel et Méthodes - Immunoélectrophorèse) pendant 1 h. 30 à 15 mA et 150 volts. A la fin de l'électrophorèse, ils sont incubés avec du IgG MT dilué à + 4°C jusqu'à cinq, six jours. Aucun arc de précipité n'a été observé sauf pour l'extrait de feuilles virosées (Figure 5 a).

Les jus des plantules du Tabac "Samsun" et "Xanthi" sain et infecté extraits par le chloroforme et qui ont réagi positivement dans le test au latex sont utilisés. 0,04 ml de chaque jus dénaturé avec 0,01 ml de solution au β mercapto-éthanol (cf. Matériel et Méthodes, Techniques Diverses page) sont déposés à la surface du gel de polyacrylamide. Le temps d'électrophorèse est de deux heures à 90 - 120 mA et 50 volts.

A la fin de la décoloration nous n'avons observé aucune bande correspondant au virus dans tous les extraits analysés, alors que dans les extraits à partir des feuilles virosées on voit très nettement la bande correspondant du VMT (Figure 5b), indiqué par une flèche.

Fig. a) Immunoélectrophorèse d'extrait des plantules saines (J.S.) et virosées. (J.V.)

b) Analyse électrophorétique d'extrait de plantules virosées et du virus purifié en gel de polyacrylamide.

J.S.: jus viros°; V.P.: virus purifié.

C - OBTENTION DE PROTOPLASTES DE POLLEN.

Pour déceler le VMT après la méiose par immunofluorescence, nous avons entrepris d'obtenir des protoplastes de pollen.

1. Essais à partir de pollen mûr

Nous avons mis en présence le pollen et différentes cellulases commerciales, en particulier la cellulase "Onozuka" qui agit sur les parois cellulaires du Tabac (TAKEBE et Coll., 1968) et l'hélicase. Nous avons aussi eu l'idée de faire apparaître le tube pollinique par une préincubation dans une solution de saccharose avant d'ajouter les enzymes. Nous n'avons observé qu'une augmentation de la plasticité de la membrane cellulosique à la suite de ces traitements, le tube pollinique devenant sphérique.

Nous avons également eu l'idée de substituer au sucre une force ionique élevée par l'utilisation de phosphate trisodique à différentes concentrations, sel qui a, de plus, l'intérêt de décontaminer en surface les grains de pollen. Nous avons alors observé un phénomène de séparation de l'exine du grain de pollen. (Photo 7a)

Photo 7 a: Séparation de l'exine après traitement par PO_4Na_3

Photo 7b: Etat de cellules sans exine, après incubation de trois, quatre heures dans une solution de saccharose à 5 %.

La séparation de l'exine est observée à partir de 0,4% de phosphate trisodique mais, pour obtenir le phénomène avec un rendement de 80%, une concentration de 0,9 % pendant dix, vingt minutes est préférable. La même concentration de phosphate trisodique n'a aucun effet sur le grain de pollen non mûr. Nous avons essayé de voir si cette séparation est dûe à la concentration du Na^+ ou au pH. A cet effet nous avons utilisé les solutions à 1 M de phosphate disodique, phosphate monosodique, phosphate monopotassique et Na EDTA avec phosphate trisodique. Seul le phosphate trisodique à pH 13 a abouti à la séparation. Par contre, si le pollen est recueilli dans une solution de saccharose à 5 % et qu'ensuite le phosphate trisodique est ajouté, la séparation ne se produit pas.

Le pH est alors K 8,5. Notons qu'après ce traitement salin, les enzymes n'ont aucun effet sur les parois.

Nous avons essayé l'immunofluorescence indirecte avec ces cellules partiellement débarassées de leurs parois après fixation dans le formol à 1%. Nous n'avons pas observé la fluorescence spécifique de l'antigène. Un bref traitement par les ultrasons dans l'espoir de rendre les cellules permé-ables aux anticorps n'a donné aucun résultat positif.

2. Obtention à partir du pollen immature.

Au cours de nos essais sur la mise au point de la technique d'obtention des protoplastes de pollen mûr, cette même technique a été décrite par BHOJWANI et COCKING, 1972, à partir de pollen au stade tétrade.

Nous nous sommes donc orienté dans cette voie et avons préparé des protoplastes à partir des cellules-mères de pollen (Photo 8a)(boutons de Tabac Samsun d'environ 3 - 4 mm) et des tétrades (boutons de 5 - 7 mm). (Photos 8 b). On constate un gradient de développement des tétrades dans les anthères de chaque bourgeon disséqué, après coloration par le carmin acétique.

Photo 8 a) Cellules-mères
b) Tétrades.

La corrélation entre la taille du bouton et le stade d'évolution de l'anthère est contrôlée pour chaque bouton par dissection d'une anthère dans le carmin acétique.

Les anthères choisies sont disséquées dans 2% d'enzyme hélicase de Hélix pomatia "Spécial" (Insdustrie Biologique Française, Gennevilliers) et 7% de saccharose. Le pH est ajusté à 5,4 et l'incubation est faite à 37°C. Outre son activité cellulasique, la préparation enzymatique hélicase contient une activité callasique qui se manifeste de façon très spectaculaire dans la première 1/2 heure par la séparation des cellules de la tétrade. Au bout de deux à trois heures d'incubation, on peut observer les protoplastes. (Photos 9a et b).

On contrôle la disparition de toute membrane cellulosique en ajoutant à la préparation du "Calcofluor white" à 5 % qui se lie à la cellulose et devient fluorescent quand on l'excite dans le bleu violet, ce qui permet une détection très sensible. On constate que le rendement en protoplastes est de 30% environ.

Photo 9 a - Photoplastede cellules - mères du pollen.
b - Protoplastedu tétrade du pollen.
c - Protoplastedu pollen en relief.

On arrête l'action des enzymes en ajoutant à la mixture de la

glutaraldéhyde jusqu'à la concentration finale de 1 %. Après une nuit à 4°, les protoplastes sont lavés à l'eau et fixés sur des lames propres et dégraissées.

Après un séjour dans l'eau physiologique tamponnée, ces lames sont prêtes pour la détection du VMT par immunofluorescence.

D - DETECTION DE L'INFECTION PAR IMMUNOFLUORESCENCE et IMMUNOPEROXYDASE.

1. Sur le bouton floral.

Nous avons appliqué les deux techniques immunologiques sur les coupes à la paraffine des trois stades des boutons floraux de taille 2 à 7 mm. Ces mêmes stades ont été utilisés pour le test de pouvoir infectieux et le test au latex.

Les coupes transversales ou longitudinales étant en série, permettent de suivre la localisation de l'antigène dans un certain nombre de coupes d'un même échantillon.

Nous avons pu repérer les tissus infectés par immunofluorescence directe et par immunoperoxydase dans différentes parties des boutons floraux à ces différents stades. Comme le montre le tableau 13.

Tableau 13 :

Mise en évidence de l'infection par le VMT dans des boutons floraux, par immunofluorescence et immunoperoxydase.

	Immunofluorescence			Immunoperoxydase		
	Stades des boutons			Stades des boutons		
Parties des boutons	1	2	3	1	2	3
Sépale	+	+				
Pétale	+			+	+	
Filet	+	+	+		+	
Anthère (vaisseau)	+	+	+	+		+
Pollen		-	-		-	-
Ovaire	+	+	+		+	+

L'infection est révélée dans la technique d'immunofluorescence par des plages vert brillant. Nous avons observé que l'infection des sépales et pétales est extrèmement localisée (Photos 10a et b) et plus souvent à la base du bouton. Les filets, dans tous les stades, ont donné une fluorescence caractéristique surtout sur la marge des vaisseaux des filets. (Photo 11,12). L'infection de l'étamine est observée seulement sur les vaisseaux des filets (Photo 11,12,13). Les autres parties de l'étamine sont d'un vert complètement éteint. Les cellules en début de différenciation, comme les cellules-mères du pollen aux stades 1 et 2 (Photo 12a,b,c), présentent une coloration uniforme verte sans aucune plage vert brillant. Les tétrades au stade 3 présentent une coloration jaune complètement éteinte (Photo 14). Nous avons observé une fluorescence nette du placenta aux stades 1 et 2 (Photo 15) et les parois ovariennes du stade 3 (Photo 16a). Cependant les tissus placentaires jeunes ainsi que les ovules donnent une fluorescence uniforme verte qui rend difficile l'observation d'une fluorescence dûe à l'infection. (Photo 16b).

Les témoins - des boutons floraux infectés mais incubés avec du tampon - présentent une coloration vert éteint. Des boutons floraux sains incubés avec du conjugué homologue, les boutons floraux infectés avec du conjugué hétérologue ont donné une coloration jaune vert générale quand il s'agit d'organes jeunes comme de jeunes ovaires peu différenciés.(Ph, 16, 18).

Nous avons soumis ces mêmes échantillons à l'immunoperoxydase pour ne pas être gêné par la fluorescence propre de notre matériel d'étude. L'infection est révélée dans cette technique par la coloration brun-noir des parties infectées.(Ph. 22, 25).

Les images des parties infectées dans tous les stades restent les mêmes que dans la technique précédente. Si la partie d'anthère qui se différencie, comme les cellules-mères, donne une légère coloration brune, les tétrades du stade 3 n'ont donné aucune coloration. Donc l'immunoperoxydase a apporté une confirmation, sinon, à défaut, des renseignements supplémentaires.

Grâce à ces deux techniques nous avons localisé l'infection dans des boutons floraux.

2. Sur les protoplastes de pollen correspondant aux stades cellule-mère et tétrade.

Les protoplastes de pollen de Tabac sain et infecté obtenus

à partir du stade cellule-mère et à partir du stade tétrade ont été étudiés par la technique de l'immunofluorescence directe et indirecte. (Matériel et Méthodes page 27).

Nous n'avons observé aucune fluorescence du type vert brillant dans des protoplastes de Tabac infectés au stade cellule-mère ou tétrade, même si les protoplastes infectés montrent un degré de coloration vert jaune plus intense que les protoplastes de Tabac sain correspondants.(Photo 19).

Nous concluons donc que, dans les limites de sensibilité de la méthode, le pollen aux stades de cellule-mère et de tétrade ne sont pas atteints par le virus.

3. Sur les graines.

Les coupes à partir de nos différents lots de graines - dès la récolte, après trois mois et neuf mois de conservation, et avant la maturité - sont soumises à l'immunofluorescence directe et à l'immunoperoxydase.

Les coupes transversales ou longitudinales des graines présentent la structure anatomique ainsi montrée dans la figure 6.

Nous avons plus souvent observé l'infection par immunofluorescence dans la couche nucellaire des téguments des graines de Tabac infecté. L'infection est caractérisée dans cette couche par une fluorescence vert-bleu. Nous avons aussi observé une fluorescence vert un peu brillant dans la première assise des cellules immédiatement après la couche nucellaire.(Photo 20). La membrane externe de la cellule épidermique donne un jaune complètement éteint tandis que la couche striée donne une fluorescence vert jaune. La partie albumen et l'embryon donnent une fluorescence vert-jaune générale, dans la graine de Tabac infecté et dans la graine témoin de Tabac sain, traité avec du conjugué homologué ainsi d'ailleurs que la graine témoin de Tabac infecté traitée avec du conjugué hétérologue. Cette fluorescence est éteinte dans la graine témoin de Tabac infecté traitée avec de l'eau physiologique tamponnée.

Ces mêmes coupes de graines ainsi que d'autres coupes fixées au méthanol-ferricyanure et acide acétique ou au méthanol pur, soumises à l'immunoperoxydase (Matériel et Méthodes, page 32) ont bien donné une coloration brune des couches nucellaires, de hile et des parois de la couche épidermique la plus externe. Néanmoins notre témoin -graines infectées incubées avec de l'eau physiologiques tamponnée -, présente aussi

une certaine coloration brune de la couche nucellaire, indice d'une inactivation imparfaite des peroxydases endogènes.

Nous avons donc localisé l'infection du VMT chez les graines du Tabac par la technique de l'immunofluoreseence, principalement dans les couches nucellaires des téguments.

Fig. 7 - Coupe verticale à travers une graine adulte de Nicotiana Rustica, var. cult "Kapa": D'après Ioan GRINTESCU, Bucarest, 1915)
(Le Tabac, G. CAPUS, F. LEULLIUF et E. FOEX, 1979).

DISCUSSION ET CONCLUSION

La transmission des virus végétaux par la graine dépend de la relation entre la plante-hôte et le virus. Cette transmission, peu fréquente parmi les complexes hôte-virus décrits, semble suggérer l'existence d'un phénomène de barrière, comme l'a proposé ALLARD (1915) pour le virus de la Mosaïque du Tabac chez Tabac.

Notre hypothèse de travail, formulée dans la dernière partie de l'historique, est que la progression du VMT est arrêtée à l'un des niveaux ou à plusieurs des niveaux suivants :

l'ébauche florale,

le pollen,

la graine,

la plantule.

Préciser le ou les stades où se produit l'arrêt de la progression a été l'objet de cette étude, élément essentiel dans la compréhension du mécanisme de la non-transmission du virus d'une génération à l'autre.

Nous avons supposé que le VMT ne progresse pas jusqu'aux ébauches florales du fait de l'action inhibitrice conjuguée de l'activité méristématique et de l'initiation de la floraison. SHEFFIELD (1942) n'a trouvé aucune inclusion intracellulaire dans les méristèmes apicaux même quand ils ont été trouvés infectieux. D'ailleurs une publication très récente (TSUCHIZAKI et Coll., 1971) établit une relation intéressante entre la transmission par la graine et le niveau d'infection du dôme méristématique. Ces auteurs ont observé au microscope électronique des particules virales dans des coupes faites dans le dôme méristématique à une distance de l'apex comprise entre 100 et 200 µ, ceci chez Phaseolus angularis et Vigna sinensis qui permettent la transmission du virus de la Mosaïque du Haricot "Azuki" et du "Cowpea - aphid borne mosaic virus ". Chez les complexes hôtes-virus qui ne transmettent pas le virus par la graine, aucune particule virale n'a été observée jusqu'à 300 µ. Ce fait a donc amené les auteurs à proposer l'hypothèse que le virus infectant le méristème floral pourrait infecter le pollen et les ovules et, par la suite, être transmis à la plantule.

Au stade I du bouton floral du Tabac - stade caractérisé par une taille de 2 mm, avec les premières ébauches de sépales, d'étamines et de pistil peu ou pas différenciés - que nous avons étudié par l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase, nous n'avons repéré aucune infection de la région méristématique. Mais l'infection a été observée dans les sépales (Photo 10a,22a) les pétales -(Photo 10b,22), les filets (Photo 11,12), les anthères (Photo 12,14,13,23) et les ovaires (Photo 15,25) de ce même stade. Ce stade pourrait être plus avancé que les territoires méristématiques excisés de la phase d'initiation de la floraison jusqu'au stade de méristème floral présentant les premières ébauches de sépales que MARTIN et Coll., (1967) ont mis en culture in vitro, et qui ont donné des petites plantes végétatives "saines". Les stades plus avancés ont évolué, en culture, vers les boutons floraux, ce qui ne permet pas une confrontation avec nos résultats. Nous avons montré que six stades de boutons floraux de deux à quinze mm. étudiés, après dissection, par la méthode du pouvoir infectieux ont été trouvés infectieux sauf quelques boutons entiers du stade I et l'étamine et le pistil du stade II du premier essai. Les étamines et le pistil se sont révélés moins infectieux que les sépales et les pétales dans les deux essais. Ainsi la concentration du virus présent aux différents stades s'échelonne de 0,001 à 0,005 µg/ml de tissu broyé dans le cas des étamines et du pistil et de 0,005 µg à 0,02 µg/ml dans le cas des sépales et des pétales en adoptant la correspondance entre cinq lésions et 0,001 µg/ml du virus (FRAENKEL - CONRAT, 1969).

Les différentes parties des fleurs disséquées sont toutes infectieuses et la concentration de VMT dans le calice et la corolle est plus grande que dans les étamines et le pistil. Les pistils ont été moins infectieux que les étamines; ceci est aussi à relier à nos observations en immunofluorescence et immunoperoxydase sur les boutons floraux et les fleurs où a été mise en évidence l'infection des vaisseaux du filet (Photo 11,13,23) plus fréquemment que celle des parois ovariennes ou du placenta (Photo 15,17,25).

On peut alors s'attendre à ce que cette faible concentration du virus dans l'étamine et le pistil soit associée à la non-infection du pollen et des ovules, comme l'ont observé TSUCHIZAKI et Coll. (1970) dans le cas du complexe hôte-virus ne transmettant pas le virus par rapport à un complexe qui le transmet.

Comme nous avons vu dans notre étude du pouvoir infectieux avec du pollen (page 42) le tampon, après lavage du pollen au cours de trois

essais , et sur un total de dix huit répétitions, a enregistré une moyenne de 0,2 lésion locale et le pollen lavé et broyé, un maximum de deux lésions locales dans un essai, ce qui est un résultat non significatif.

De même, les broyats des graines de deux capsules issues d'une fécondation artificielle par le pollen infecté, ont réagi avec une moyenne de trois et 0,5 lésions locales au cours de deux répétitions, ce qui ne permet pas d'aboutir à une conclusion positive avec un haut degré de certitude.

De plus, on peut considérer que cette infection résiduelle est dûe au fait que nous avons utilisé le pollen non lavé et que le virus contaminant l'exine du pollen aurait provoqué l'infection du pistil. Donc en comparaison avec des virus transmis par le pollen où le pourcentage de transmission est supérieur à 10% (GOLD et Coll., 1954; NELSON et DOWN, 1933; CALLAHAN, 1957; TSUCHIZAKI et Coll., 1971), nous considérons que la transmission du VMT par le pollen est pratiquement nulle. Ceci ne signifie pas nécessairement que le pollen de Tabac ne peut pas assurer la replication du VMT et une expérience directe d'infection des protoplastes de pollen pourrait maintenant répondre à cette question.

D'ailleurs BROADBENT (1965) a signalé une infection par VMT du pollen de Tomate, hôte qui ne transmet pas le virus à la plantule de façon directe, mais dont 10% des albumens sont infectés.

La relation entre l'infection du pollen et l'infection de l'albumen n'est pas difficile à concevoir dans ce cas. Il est cependant plus compliqué de comprendre pourquoi l'albumen seul serait infecté; peut-être faudrait-il voir si les modalités précises de la fécondation sont les mêmes que celles décrites chez les Graminées (GODINEAU, Congrès de Morphogenèse - GIF S/YVETTE, Mars 1972) où le tube pollinique n'atteint pas l'oosphère, le cytoplasme pollinique et le virus se retrouvant alors dans l'albumen.

Ces résultats négatifs de recherche du VMT dans le pollen nous ont logiquement conduit à rechercher le virus aux stades antérieurs où les microscopores ont encore des connections cytoplasmiques avec les tissus voisins (HELSOP HARRISON, 1966) et où se déroule le phénomène de la méiose, qui peut intervenir dans la progression du virus (CALDWELL, 1962) (LAPIERRE et Coll., 1970).

En examinant deux stades qui encadrent la méiose, le stade des cellules-mères du pollen, dans le bouton floral de taille 3 à 4 mm., et les tétrades, produits de la méiose dans les boutons de taille 5 à 7 mm., nous avons conclu que la méiose n'est pas le phénomène qui arrête la progression du VMT.

En effet comme nous avons pu le suivre par immunofluorescence et immunoperoxydase sur des coupes ou sur des préparations de protoplastes, aucune fluorescence spécifique de l'infection n'a été observée, la fluorescence homogène verte des cellules-mères dans les lobes de l'anthère (Photo 12a,b,c) étant assimilée au bruit de fond.

Les tétrades, dans les anthères, ne nous ont aussi montré qu'une coloration éteinte dans le jaune. L'immunoperoxydase a confirmé l'observation obtenue par immunofluorescence. Les protoplastes soumis à l'immunofluorescence n'ont révélé de façon sensible aucune infection. Il faut également remarquer que, seule, la partie vasculaire du filet et de l'anthère est infectée, les autres parties de l'anthère ne donnant aucune coloration brune en immunoperoxydase et une fluorescence jaune éteinte en immunofluorescence, et ceci dans les trois stades. Ainsi la barrière principale dans la progression du VMT se situe au niveau du méristème à partir duquel vont se différencier les pièces florales (pollen et ovules). A ce stade, toutes les cellules engagées dans la sporogenèse ont définitivement échappé au virus qui pourtant a été repéré jusqu'à la paroi ovarienne.

Malgré l'absence de VMT dans le pollen et les ovules nos lots de graines de N. tabacum Samsun et N. tabacum Xanthi (30°C) issus de plantes infectées se sont montrés très infectieux (Tableau 5).

On a vu en effet que le nombre des lésions locales induites sur N. tabacum Xanthi par inoculation d'un broyat de N. tabacum Samsun infecté (N° 2, 3 et 4) approchait 200, 250 et 400 pour le lot de graines de Xanthi infecté à 30°C (N°7). Ces nombres de lésions locales correspondant à la région exponentielle de la courbe de dosage du pouvoir infectieux, une transformation du nombre de lésions locales en concentration de virus, donne 0,04 à 0,05 µg/ml pour les lots Samsun infectés et 0,08 µg/ml pour les lots Xanthi.

Le problème maintenant consiste à localiser le VMT dans les tissus de la graine et à suivre l'évolution du pouvoir infectieux.

Dans une étude analogue, basée sur le test de pouvoir infectieux, TAYLOR (1967) conclut à un pourcentage d'infection de 7,8% pour les téguments et 2,6% pour l'ensemble albumen-embryon. Pour éviter les risques de contamination, lors de la dissection, nous avons seulement utilisé le test de pouvoir infectieux pour montrer que le virus est bien à l'intérieur

de la graine, par lavage des graines avec un tampon ou avec du phosphate trisodique . Mais pour l'étude du VMT in situ nous avons utilisé l'immunofluorescence. Comme nous avons vu (Tableau 6), les traitements de lavage n'entraînent aucune réduction du pouvoir infectieux des graines et ceci est donc en plein accord avec TAYLOR (loc. cit.) Nous avons repéré de façon très nette, par immunofluorescence, le VMT dans la couche nucellaire des graines (Photo 20) mais l'albumen ne présente qu'une coloration éteinte homogène à l'exception de son assise cellulaire périphérique, contigüe à la couche nucellaire, dont le vert est éclairci. Compte tenu des relations physiologiques entre l'albumen et la couche nucellaire, on peut, à titre d'hypothèse, interprêter cette observation comme la diffusion à travers la membrane cellulosique de l'albumen de produits de dégradation de la capside ayant conservé quelques sites antigéniques.

Enfin l'embryon ne présente pas de fluorescence spécifique du VMT.

Nous concluons donc que, dans les lots de graines étudiés, le VMT est à l'intérieur des graines, y infecte les téguments, mais pas l'albumen contrairement aux déductions de TAYLOR (loc. cit.). Ceci explique l'obtention de plantules saines de Tabac à partir de graines infectées même après repiquage (ALLARD, 1915 ; TAYLOR , loc. cit.) par opposition aux plantules infectées de la Tomate où le virus à la surface des graines contamine les plantules pendant le repiquage (TAYLOR, 1961; BROADBENT, 1965).

Il est intéressant, pour ne pas négliger l'aspect pratique de cette étude, de voir comment évolue le pouvoir infectieux au cours de la conservation des graines.

Nous avons observé une nette réduction du pouvoir infectieux dans la plupart des lots, certains n'ayant plus de virus sous forme infectieuse après neuf mois de conservation, alors que d'autres étaient encore infectieux après dix neuf mois.

La dessication des téguments permet-elle seule d'expliquer ce phénomène ?

L'analyse de la transmission du VMT par la graine de Tabac ne pouvait être complète sans l'analyse des plantules,

Comme nous l'avons vu (page 47) les plantules issues de nos lots de graines infectées n'ont manifesté aucun symptôme, même après repiquage, La possibilité d'une infection latente comme dans le cas de la Mosaïque du Chénopode (DIAS et WATERWORTH, 1966) ou dans le cas de

plantules à partir des graines de plante "guérie" (LISTER et MURANT, 1967) a été contrôlée par le test du pouvoir infectieux des plantules. Tous nos essais se sont révélés entièrement négatifs et l'utilisation du phénomène d'hypersensibilité chez N.tabacum Xanthi n'a pas apporté d'autre renseignement. La plupart des plantules, même à un stade précoce, permettent la replication virale comme nous l'avons vérifié. Le cas de quelques plantules qui n'ont pas présenté de symptômes reste à éclaircir.

En utilisant les méthodes sérologiques - qui sont moins sensibles que le dosage biologique, mais qui permettent de déceler le virus non infectieux - nous avons eu la surprise de réaliser un test au latex positif aussi bien dans les épreuves des plantules saines que dans celles des plantules issues de graines infectées, et ceci, quelle que soit la méthode de clarification de l'extrait de plantule. En fait, ce jus de plantule a la propriété d'agglutiner même le latex non sensibilisé. Deux autres tests: immunoélectrophorèse et électrophorèse en gel de polyacrylamide n'ont, par la suite, pas permis de déceler une trace d'antigène viral dans ces plantules.

En conclusion, le passage du virus de la Mosaïque du Tabac infecté aux plantules de Tabac de la génération suivante est essentiellement freiné par l'activité méristématique. Malgré l'influence inhibitrice conjuguée de l'induction de la floraison, le VMT réussit à infecter les pièces florales, mais seulement par plages très localisées. Le pollen et les ovules ont alors échapp à l'infection et le processus d'embryogenèse se déroule sans virus.

Cependant le VMT, qui a pu gagner la paroi ovarienne, se retrouve dans les téguments externes de la graine. Mais l'état physiologique de la graine est défavorable à une replication virale, et on assiste pendant sa conservation à une perte progressive du pouvoir infectieux. Le VMT n'est pas adsorbé par la surface de la graine de Tabac, contrairement à ce qui se passe chez la Tomate, cela explique l'absence de contamination des plantules.

Cette contamination, si elle se produisait, serait en effet immédiatement décelée, car les plantules, même dans un stade très précoce, sont capables d'assurer la replication du VMT.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABU TALIH H.S., MURANT A.F. et DAFT M.J., 1968. Comparison of the passive haemagglutination and bentonite test for serological work with plant viruses. J.gen Virol. 2, 155-166.

ALEXANDER J., 1960. Inactivation of TMV from tomato seeds. Phytopathology 50 (9), 627.

ALLARD H.A., 1915. Distribution of the virus of the mosaic diseases in capsules, filaments, anthers and pistils of affected tobacco plants. J. agric.Res. 5, 251-256.

ASTIER-MANIFACIER S. et CORNUET P., 1971. RNA - Dependent RNA polymerase in Chinese cabbage. Biochim.Biophys.Acta, 232, 484-493.

ATHOW K.L. et BANCROFT J.B., 1959. Development and transmission of Tobacco Ring Spot virus in Soybleп. Phytopathology 49 , 697-701.

AUGIER de MONTGREMIER H., 1970. Caractérisation et isolement d'immunoglobulines antivirales chez le lapin. Application à l'étude de l'agglutinat passive. Ann.Phytopathol. 2, 617-628.

AUGIER de MONTGREMER H. et LARROQUE N., 1972. Purification de gamm globulines par précipitation fractionnée à l'éthanol. Influence de la pureté des gamma-G. sur la sensibilité du test au latex. Ann.Phytopathol. 4, 55-58.

AVRAMEAS S. et TERNYNCK T., 1969. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. Immunochemistry 6, 53-66.

BAKER K.F., et SMITH S.H., 1966. Dynamics of seeds transmission of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathology 4 , 311-314.

BENNETT C.W., 1934. Plant-tissue relations of the sugar-beet curly-top virus. J.agric.Res. 48 , 665-701.

BENNETT C.W., 1940. The relation of viruses to plant tissues. Bot.rev. 6, 427-473.

BENNETT C.W. , 1969. Seed transmission of plant viruses. Adv. virus Res., 14, 221-261.

BENNETT C.W. et ESAU K., 1936. Further studies on the relation of the curly top virus to plant tissues. J.agric.Res., 53, 595-620.

BENNETT C.W. et COSTA A.S., 1961. Sowbane mosaic virus caused by a seed transmitted virus. Phytopathology 51, 546-550.

BERCKS R., 1966. Methodische Untersuchungen über der serologischen Nachweis pflanzen-pathogener Viren mit dem Bentonit-Flockungstest, dem Latex test und dem Bariumsulfat-test. Phytopathol.Z., 58, 1-17.

BERCKS R., QUERFURTH G., 1969. Weitere methodische Untersuchungen über den Latex test zum serologischen Nachweis pflanzenpathogener viren. Phytopathol. Z. 65, 243-256.

BHOJWANI S.S. et COCKING E.C., 1972. Isolation of protoplasts from pollen tetrads. Nature 239, 29-30.

BOZICEVICH S., SCOTT H.A. et VINCENT M.M., 1966. The bentonite flocculation test for detection of plant viruses and titration of antibody. Soc. Exp. Med., Proc. 114, 750-754.

BROADBENT L., 1965. The epidemiology of Tomato mosaic, XI Seed Transmission of TMV. Ann. appl. Biol. 56(2), 177-205.

CADMAN C.M., 1965. Filamentous viruses infecting fruit trees and raspberry and their possible mode of spread. Plant Dis. Tept. 49, 230-232.

CALDWELL J., 1952. Some effects of a plant virus on nuclear division. Ann. appl. Biol. 39, 98-102.

CALDWELL J., 1962. Seed transmission of viruses. Nature 193 (4814), 457-459.

CALLAHAN L., 1957. Pollen transmission of Elm Mosaic virus. Phytopathology 47, 5.

CHAMBERLAIN E.E., 1937. Tobacco mosaic. New Zealand J. Sci. and Technol. 19, 209-226.

CHAMBERLAIN E.E. et FRY P.R., 1950. Influence of the method of tomato seed extraction on seed transmission of tobacco mosaic and streak. New Zealand J. Sci. et Technol. (A). 32, 19-23.

CHEO P.C., 1955. Effect of seed maturation on inhibition of southern bean Mosaic virus in bean. Phytopathology 45, 17-21.

COUSIN M.T., 1961. Recherches sur la transmission du virus de la Mosaïque du Tabac par les semences de Tomate. Vérification de cette transmission et localisation du virus dans la graine. Et. Virol. appl. 2, 49-56.

CROWLEY N.C., 1955. The effect of seed extracts on infectivity of plant viruses and its bearing on seed transmission. Austral. J. biol. Sci 8, 56-67.

CROWLEY N.C., 1957. The effect of developing embryos on plant viruses. Austral. J. biol. Sci. 10, 443-448.

CROWLEY N.C., 1957. Studies on the seed transmission of plant virus diseases. (RAM 37 (5), 169-270, 1958). Austral. J. biol. Sci. 10, 449-464.

CROWLEY N.C., 1959. Studies on the time of embryo infection by seed transmitted viruses. Virology, 8, 116-123.

COUCH B., 1955. Studies of seed transmission of lettuce mosaic virus. Phytopathology, 45, 63-70, 1955.

DEVERGNE J.C. et CARDIN L., 1967. Isolement, purification et analyse immuno-électrophonétique des virus du "Mottle" et du "Ringspot" de l'oeillet. Ann. Epiphyties, 18, 65-83.

DIAS H.F. et WATERWORTH H.E., 1967. The identity of a seed-borne mosaic virus of Chenopodium amaranti color and C. quinoa. Canad. J. Bot., 45, 1285-1295.

DUGGAR B.M., 1930. The problem of seed transmission of typical mosaic of tobacco. Phytopathology, 20, 133.

FELDMAN J.M., 1963. Effet inhibiteur des extraits de semence de Piment (capsicum annuum L) sur le pouvoir infectieux de quelques virus des plantes. Ann. Epiphyties, 14, 377-385.

FERAULT A.C., SPIRE D., BANNEROT H., BERTRANDY J. et LE TAN T., 1969. Identification dans la région parisienne d'une marbrure du Haricot comparable au Bean Southern Mosaic Virus (Zaumeyer et Harter) Ann. Phytopathol., 1, 619-626.

FORD R.E., 1966. Recovery of Pea Streak virus from Pea Seed parts and its transmission by immature seed. Phytopathology, 56, 858-859.

FRAENKEL - CONRAT H., 1969. Quantitative assay by local lesions. The chemistry and biology of viruses. Academic Press., New York, London page 9

FULTON R.W., 1964. Transmission of plant viruses through grafting, dodder, seed and mechanical inoculation (dans M.K. Corbett and H.D. Sisler (ed)). Plant Virology 39 - 57 pp. Univ. Florida Press, Gainesville pages 527.

GEORGE J.A. et DADIDSON T.R., 1963. Pollen transmission of necrotic ring spot and sour cherry yellows from tree to tree. Canad J. Plant Sci., 43, 276-288.

GILMER R.M. et KELTS L.T., 1968. Transmission of TMV in grape seeds. Phytopathology, 58, 277-284.

GILMER R.M. et WAY R.D., 1960. Pollen transmission of necrotic ringspot and prune dwarf viruses in sour cherries. Phytopathology, 50, 624-625.

GILMER R.M. et WAY R.D., 1963. Evidence from tree to tree transmission of sour cherry yellows virus by pollen. Plant. Dis. Rept., 47, 1051-1053.

GILMER R.M. WILKS J.M., 1967. Seed transmission of Tobacco mosaic virus in apple and pear. Phytopathology, 57, 214-217.

GOODING G.V. et HEBERT T.T., 1967. A simple technique for purification of Tobacco mosaic virus in large quantities. Phytopathology, 57, 1285.

GOLD A.H., SUNESON C.A., HOUSTON B.R. et OSWALD J.W., 1954. Electron microscopy and seed and pollen transmission of rod shaped particles associated with the false stripe virus disease of Barley. Phytopathology, 44,115-117.

GRABAR P., WILLIAMS C.A., 1955. Immunoelectrophorèse de substances antigéniques. Biochim. Biophys. Acta., 17, 67-72.

GRISON C. et MARTIN C., 1961. Contribution à l'étude du comportement des virus végétaux chez leurs hôtes hypersensibles. Ann. Epiphyties, 12, 89-94.

HELSOP - HARRISON J., 1966. Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants. Endeavour, 25, 65-72.

JENSEN W.A., 1962. Botanical Histochemistry-Principles and Practice. W.H.Freeman and Company San Francisco and London. 408 pages.

JERMOLJEV E. et ALBRECHTOVA L., 1965. Application d'une suspension de latex au diagnostic sérologique des maladies à virus des plantes (Tchèque). Ochr. Rost., 2 , 51.

JOHN C.A. et SOVA C., 1955. Incidence of TMV on tomato. Phytopathology, 45, 636-637.

KAUSCHE G.A., 1940. Uber eine das Virus protein inaktivieren de Substanz im Samen von Nicotiana tabacum Samsun. Biol. Zentrabl., 60 , 423-428.

KUO C., AUGUST J.H., 1972. Histone or bacterial basic protein required for replication of bacteriophage RNA. Nature, 237, 105-107.

LAPIERRE H., LEMAIRE J.M., JOUAN B. et MOLIN G., 1970. Mise en évidence de particules virales associées à une perte de pathogénicité chez le Piétin-échaudage des Céréales, Ophiobolus graminis Sacc. Acad. Sci. Paris, 271, 1833-1836.

LEMOINE J. Anomalies des styles des anthères et des graines de pollen induites par diverses souches de virus du Poirier. 8è Symposium Européen sur les maladies à virus des arbres fruitiers. Ann. Phytopathol. H.S., 3 , 1971.

LIMASSET P. et CORNUET P., 1949. Recherche du virus de la Mosaïque du Tabac (Marmor tabaci, Holmes) dans les méristèmes des plantes infectées. C.R.Acad.Sci. Paris., 228, 1971-1972.

LISTER R.M. et MURANT A.F. 1967. Seed transmission of nematode borne viruses. Ann. appl. Biol. , 59, 49-62.

MAHESHWARI P., 1950. An introduction to the embryology of Angiosperms. McGraw-Hill, New York, 435 pages.

MAIA E., 1967. Contribution à l'étude d'inhibiteurs de virus phytopathogènes. Thèse Doctorat ès Sciences. Univ. de Strasbourg.

MANSI W., 1958. Slide gel. diffusion precipitin test. Nature 181, 1289 - 1290.

MARENAUD C., 1965. Effet du virus sur la germination de graine du pollen du Prunus persica lignée G.F. 305. C.R.Acad. Agric. Fr. 51, 881-888.

MARTIN C. et GALLET M., 1966. Nouvelles observations sur le phénomène d'hypersensibilité aux virus chez les végétaux. C.R. Acad. Sci., Paris. 263, 1316-1318.

MARTIN C., HUBERT D. et Monique CARRE, 1967. Sur la possibilité de rendre des plantes virosées indemnes de virus par la culture de méristèmes inflorescentiels et floraux. C.R. Acad. Sci. Paris, 264, 1994-1996.

MATTHEWS R.E.F., 1970. Assay and Methods of transmission and infection dans (Plant Virology) 12-34 et 135-164. Academic Press, New York and London, pp 778.

MAZJAD Kh. M., 1971. Taux de la transmission de maladies virales de Vigna par les semences. (Russ.) Bull. Inst. Rech sur la protection des Végétaux N°20, 39-41. Leningrad.

Mc DONALD J.G. et HAMILTON R.I., 1972. Distribution of Southern Bean Mosaic virus in the seed of Phaseolus vulgaris. Phytopathology 62, 387-389.

Mc KINNEY H.H., 1952. Two strains of TMV-one of which seed-borne in an immune pungent pepper. Plant Dis. Rept. 36, 184-187.

MEDINA A. et GROGAN R.G., 1961. Seed transmission of Bean Mosaic Virus. Phytopathology, 51, 452-456.

MURANT A.F. et LISTER R.M., 1967. Seed transmission in the ecology of nematode borne viruses. Ann. appl. Biol., 59, 63-76.

NAGARAJ A.N., 1965. Immunofluorescence studies on synthesis and distribution of TMV antigen in tobacco. Virology, 25, 133-142.

NELSON R., 1932. Investigations in the mosaic diseases of bean. Mich. Agr. exptl. Sta. Tech. Bull. 118, 3-71.

NELSON R. et DOWN E.E., 1933. Influence of pollen and ovule infection in seed transmission of bean mosaic. Phytopathology, 23, 25.

PEJKIC B. et SUTIC D., 1971. Morphologie et germination du pollen du Prunier (Prunus domestica var. Pozegaca) atteint par le virus de la Sharka. 8è Symposium Européen sur les maladies à virus des arbres fruitiers. Ann. Phytopathol. HS., 3; (1971).

POWELL C.C. et SCHLEGEL, 1970. Factors influencing seed transmission of squash mosaic virus in cantaloupe. Phytopathology, 60; 1466-1469.

RAYCHAUDHURI S.P., 1952. Retention of a strain of TMV in Tomato seeds. Phytopathology, 42, 114.

RAYCHAUDHURI S.P., 1968. Role of plant pathology in crop production in India. Indian Phytopath., 21, 1-13.

RYDER E.J., 1964. Transmission of common lettuce mosaic virus through gametes of the lettuce plant. Plant Dis. Rept., 48, 522-523.

SHEFFIELD F.M.L., 1941. II. The cytoplasmic and nuclear inclusions associated with severe etch virus. J.Roy.Microscop. Soc., 61, 30-45.

SHEFFIELD F.M.L., 1942. Presence of virus in the primordial meristem. Ann. appl. Biol., 29, 16-17.

SCOTT H.A., 1961. Serological detection of Barley stripe Mosaic virus in single seeds and dehydrated leaf tissues. Phytopathology, 51, (3)200-201.

SCOTT H.A., KAHN R.P., BOZICEVICH J. et VINCENT M.M., 1964. Detection of potato virus X in tubers by the bentonite flocculation test. Phytopathology, 54, 1292-1293.

SINGER J.M. et PLOTZ C.M., 1956. The latex fixation test - I. Application to the serodiagnosis of rheumatoid arthritis. Am.J.Med., 21, 888.

SINGH G.P., ARNY D.C., POUND G.S., 1960. Studies on stripe mosaic of barley, including effects of temperature and age of host on disease development and seed infection. Phytopathology, 50, 290-296.

SPIRE D., 1967. Contribution à l'étude sérologique des virus végétaux par la technique de microélectrophorèse en milieu gélosé. Ann. Epiphyties, 18, 47-63.

STRAUS W., 1971. Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. J.Histochem. Cytochem, 19, 682-688.

TAKAHASHI W.N., 1961. Ultraviolet absorption as a measure of Tobacco-mosaic nucleoprotein. Phytopathology, 41, 142-144.

TAKEBE I., OTSUKI Y. et AOKI S., 1968. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant et Cell Physiol., 9, 115-124.

TAYLOR R.H., 1962. The location of TMV in tobacco seeds. Austral. J.exper. Agric. Anim.Husb., 2, 86-89.

TAYLOR R.H., GROGAN R.G., KIMBLE K.A., 1961. Transmission of TMV in tomato seed. Phytopathology, 51, 837-842.

TOMLINSON J.A., 1962. Control of Lettuce mosaic by use of healthy seed. Plant Pathol., 11, 61-64.

TSUCHIZAKI T., HIBINO H., 1971. Seed transmission of viruses in cowpea and Azuki Bean plants. IV. Relations between seed transmission and virus distribution in apical meristem of flower bud. Ann.Phytopath. Soc.Japan, 37, 17-21.

TSUCHIZAKI T., YORA K. et ASUYAMA H. , 1970. Seed transmission of viruses in Cowpea and Azuki Been plants. II. Relations between seed transmission and gamete infection. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 36, 237-242.

TSUCHIZAKI T., YORA K. et ASUYAMA H., 1971. Seed transmission of viruses in Cowpea and Azuki Bean plants. III. Relations between seed transmission and embryo infection. Ann. Phytopath. Soc. Japan , 37, 11-16.

VUITTENEZ A., 1962. Propriétés d'un virus agent d'une Mosaïque des Chenopodes. Et. Virol. Appl., 3, 15-22.

VUITTENEZ A. et KUSZALA J., 1970. Expérimentation d'amélioration récentes apportées aux techniques de détection des virus, chez la Vigne par des procédés physiques et sérologiques. 4è Conf. du groupe international d'étude des virus et des maladies à virus de la Vigne. Phytopathol. (H.S.); 1972, pages 155-163.

WEBER K. et OSBORNE M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophorèse. J.biol. Chem. ,244, 4406-4412.

WHITE P.R., 1936. Plant tissue cultures. Bot. Rev. , 2, 419-436.

WRIGHT N.S. et STACE-SMITH R., 1966. A comparison of the sensitivity of three serological tests for plant viruses and other antigens. Phytopathology, 56, 944-948.

ZAUMEYER W.J. et HARTER L.L., 1943. Two new virus diseases of beans. J.agric.Res., 67, (8), 305-328.